



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

②7 EP 0 275 285 B1

⑩ DE 37 51 918 T 2

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
A 61 K 49/00

②1	Deutsches Aktenzeichen:	37 51 918.2
②8	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US87/01588
②6	Europäisches Aktenzeichen:	87 904 772.8
②7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 88/00060
②6	PCT-Anmeldetag:	1. 7. 87
②7	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	14. 1. 88
②7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	27. 7. 88
②7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	2. 10. 96
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	20. 3. 97

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
03.07.86 US 882044 26.06.87 US 67586

⑦3 Patentinhaber:  
Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, Mass., US

⑦4 Vertreter:  
Rechtsanwälte Lichtenstein, Körner & Partner, 70184  
Stuttgart

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:  
GROMAN, Ernest, V., Brookline, MA 02146, US;  
JOSEPHSON, Lee, Arlington, MA 02174, US; LEWIS,  
Jerome, M., Newton, MA 02181, US

⑤4 BIODEGRADIERBARES SUPERPARAMAGNETISCHES MATERIAL ZUR VERWENDUNG IN KLINISCHEN  
ANWENDUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 37 51 918 T 2

DE 37 51 918 T 2

## Übersetzung

Bei dieser Patentanmeldung handelt es sich um eine Teilfortführungsanmeldung der gleichzeitig anhängigen älteren US-Patentanmeldung Nr. 882.044 des Anmelders, die am 3. Juli 1986 eingereicht wurde.

1 EINFÜHRUNG

Diese Erfindung betrifft Stoffe, die bestimmte magnetische und biologische Eigenschaften aufweisen, die sie einzigartig geeignet machen für eine Verwendung als Kontrastmittel zur Kernspintomographie, um die nach dem Magnetresonanzverfahren aufgenommenen Bilder von tierischen Organen und Geweben zu verbessern. Diese Erfindung betrifft insbesondere die In-vivo-Verwendung von biologisch abbaubaren und metabolisierbaren superparamagnetischen Metalloxiden als Kontrastmittel zur Kernspintomographie. Je nach Zubereitung liegen diese Metalloxide als superparamagnetische Teilchen-Dispersoide oder als superparamagnetische Fluids vor, wobei das Suspensionsmittel ein physiologisch annehmbarer Träger ist. Diese Dispersoide und Fluids werden an Tiere und Menschen auf eine Vielzahl von Wegen verabreicht, und die darin enthaltenen Metalloxide sammeln sich in bestimmten, abzubildenden Zielorganen an. Die Biodistribution der Metalloxide in Zielorganen oder -geweben erlaubt ein detailliertes Abbild dieser Organe oder Gewebe, da die Metalloxide aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften tiefgreifende Wirkungen auf die Wasserstoffkerne ausüben, die für das nach dem Magnetresonanzverfahren aufgenommene Bild verantwortlich sind. Außerdem sind die Dispersionen und Fluids recht stabil, wobei die Fluids sogar einer Autoklav-Behandlung unterzogen werden können,

ohne daß sich dadurch nachteilige Auswirkungen auf ihre Brauchbarkeit ergeben. Somit sind diese Stoffe gut geeignet für eine In-vivo-Anwendung.

Der Superparamagnetismus in Kombination mit der biologischen Abbaubarkeit machen die hier beschriebenen Stoffe besonders geeignet für eine Verwendung als Kontrastmittel zur Kernspintomographie. Die superparamagnetischen Eigenschaften, aus denen sich tiefgründige Fähigkeiten zur Änderung von Magnetresonanz-Bildern ergeben, ermöglichen es, diese Stoffe in Konzentrationen einzusetzen, die unter den Konzentrationen liegen, die zur Kernspintomographie mit anderen Arten von magnetischen Stoffen erforderlich sind. Die Eigenschaft der biologischen Abbaubarkeit bewirkt optimale Retentionszeiten innerhalb der abzubildenden Organe und Gewebe, d.h. die Stoffe verweilen ausreichend lange in diesen Organen und Geweben, um die Anfertigung eines Bildes zu gestatten, bevor sie schließlich aus dem Organ oder Gewebe entfernt bzw. in dem Organ oder Gewebe abgebaut werden. Bemerkenswerterweise wird bei der Verabreichung von Mitteln auf Eisenbasis das darin enthaltene Eisen letztlich metabolisiert und in das Hämoglobin des Subjekts inkorporiert.

Die besagten Stoffe können daher zu einer Vielzahl von Zwecken der klinischen Diagnose eingesetzt werden, so u.a. zur Erkennung von kanzerogenen Schäden in Leber- und anderem reticuloendotheliale Gewebe, zur Erkennung von kanzerogenen oder anderen Schäden im Darm, zur Erkennung von Leberkrankheiten wie z.B. Leberzirrhose und Hepatitis sowie zur Beurteilung der Leberregeneration. Diejenigen Stoffe, die auf Eisen basieren, sind außerdem als antianämische Mittel von klinischem Nutzen.

## 2 HINTERGRUND DER ERFINDUNG

### 2.1 In-vivo-Kernspintomographie: Allgemeine Überlegungen

Die magnetische Kernresonanzspektrometrie (NMR) findet derzeit weitverbreitet Anwendung zur Gewinnung von räumlichen Bildern von Menschen zur klinischen Diagnose. Über den klinischen Einsatz der NMR-Bilddarstellung, auch Kernspintomographie oder MRI ("magnetic resonance imaging") genannt, zu Diagnosezwecken ist bereits geschrieben worden (siehe z.B. Pykett et al., Nuclear Magnetic Resonance, S. 157 - 167 [April 1982], und Budinger, T. F., et al., Science, S. 288 - 298 [Oktober 1984]). Verschiedene Vorteile dieses Verfahrens gegenüber derzeit angewandten Diagnoseverfahren wie z.B. der Computertomographie (CT) mit Röntgenstrahlen sind allgemein anerkannt. So werden beispielsweise die in einer klinischen Abtastung nach dem Magnetresonanzverfahren (NMR-Scan) angelegten äußeren magnetischen Felder für den Menschen nicht als gesundheitsschädlich erachtet (siehe Budinger, a.a.O., S. 296). Hinzukommt, daß während CT-Röntgenbilder durch die Beobachtung eines einzigen Parameters, der Röntgenstrahlabschwächung, aufgebaut werden, MR-Bilder zusammengesetzt werden aus den Wirkungen einer Reihe von Parametern, die mit Hilfe eines Rechners ausgewertet und kombiniert werden. Die Auswahl der angemessenen Instrumentenparameter wie z.B. Radiofrequenz (Rf), Impulsgebung und Takt können zur Verstärkung (oder, umgekehrt, zur Abschwächung) der Signale eines jeden der bilderzeugenden Parameter herangezogen werden, wodurch die Bildqualität verbessert und bessere anatomische und funktionelle Informationen geliefert werden. Und schließlich hat sich der Einsatz dieser Abbildungstechnik in einigen Fällen als wertvolles Diagnosewerkzeug erwiesen, da normales und erkranktes Gewebe auf Grund ihrer unterschiedlichen Parameterwerte auf dem Bild voneinander unterschieden werden können.

Bei der Kernspintomographie wird das Bild eines Organes oder Gewebes dadurch gewonnen, daß man ein Subjekt in ein starkes äußeres Magnetfeld bringt und die Auswirkungen dieses Magnetfeldes auf die magnetischen Eigenschaften der in dem Organ oder Gewebe bzw. um das Organ oder Gewebe vorliegenden Protonen beobachtet. Die Protonenrelaxationszeiten,  $T_1$  und  $T_2$  genannt, sind von primärer Bedeutung.  $T_1$  (auch die Spin-Gitter- oder Längsrelaxationszeit genannt) und  $T_2$  (auch Spin-Spin- oder Querrelaxationszeit genannt) hängen von der chemischen und physikalischen Umgebung der Organ- oder Gewebeprotonen ab und werden anhand der Rf-Impulsgebungstechnik gemessen; diese Informationen werden dann als eine Funktion des Abstands mittels Rechner ausgewertet und von dem Rechner dann zur Erzeugung eines Bildes herangezogen.

Dem erzeugten Bild jedoch fehlt es wegen der Ähnlichkeit des von anderen Geweben ausgegebenen Signals häufig an Bildschärfe und Klarheit. Um ein Bild mit einer guten Schärfe zu erzeugen, müssen sich  $T_1$  und/oder  $T_2$  des abzubildenden Gewebes von  $T_1$  und/oder  $T_2$  des Hintergrundgewebes unterscheiden. In einigen Fällen ist der Unterschied nur sehr gering, was der diagnostischen Wirksamkeit Grenzen setzt. Es besteht daher ein wirklicher Bedarf an Verfahren, die eine Verstärkung oder Vergrößerung dieser Unterschiede bewirken. Ein Ansatz besteht in der Verwendung von Kontrastmitteln.

## 2.2 Kontrastmittel zur Kernspintomographie

Da jede zur Verwendung als ein Kontrastmittel geeignete Substanz die magnetischen Eigenschaften des umgebenden Gewebes beeinflussen muß, können Kontrastmittel zur Kernspintomographie nach ihren magnetischen Eigenschaften kategorisiert werden.

Paramagnetische Stoffe werden als Kernspintomographie-Kontrastmittel wegen ihrer seit langem anerkannten Fähigkeit zur Steigerung von  $T_1$  eingesetzt (Weinmann et al., Am. J. Rad. 142, S. 619 [1984], Greif et al., Radiology 157, S. 461 [1985], Runge et al., Radiology 147, S. 789 [1983], Brasch, Radiology 147, S. 781 [1983]). Kennzeichnend

für paramagnetische Stoffe sind eine geringe, positive magnetische Suszeptibilität und das Unvermögen, ihren Magnetismus bei Fehlen eines einwirkenden äußeren magnetischen Feldes beizubehalten.

Paramagnetische Kontrastmittel zur Kernspintomographie sind üblicherweise Übergangsmetallionen von Eisen, Mangan oder Gadolinium. Sie können mit Chelatoren gekoppelt werden, um die Toxizität des Metallions zu verringern (siehe Weinmann, a.a.O.). Paramagnetische Stoffe zur Verwendung als Kontrastmittel zur Kernspintomographie sind Gegenstand einer Reihe von Patenten und Patentanmeldungen. (Siehe EPA 0 160 522; UK-Patentanmeldung Nr. 2 137 612A; EPA 0 184 899; EPA 0 186 947; US-Patent Nr. 4.615.879; PCT WO 85/05554; und EPA 0 210 043.)

Auch ferromagnetische Stoffe finden wegen ihrer Fähigkeit zur Reduzierung von  $T_2$  Einsatz als Kontrastmittel (Medonca-Dias und Lauterbur, Magn. Res. Med. 3, S. 328 [1986]; Olsson et al., Mag. Res. Imaging 4, S. 437 [1986]; Renshaw et al., Mag. Res. Imaging 4, S. 351 [1986], und 3, S. 217 [1986]). Ferromagnetische Stoffe weisen starke positive magnetische Suszeptibilitäten auf und behalten ihren Magnetismus auch bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes bei. Ferromagnetische Stoffe zur Verwendung als Kontrastmittel zur Kernspintomographie sind Gegenstand von Patentanmeldungen jüngerer Datums (PCT WO 86/01112; PCT WO 85/04330).

Es findet noch eine dritte Klasse von magnetischen Stoffen, bezeichnet als superparamagnetische Stoffe, Einsatz als Kontrastmittel (Saini et al., Radiology 167, S. 211 [1987]; Hahn et al., Soc. Mag. Res. Med. 4(22), S. 1537 [1986]). Wie paramagnetische Stoffe lassen sich superparamagnetische Stoffe durch das Unvermögen, ihren Magnetismus bei Fehlen eines angelegten äußeren magnetischen Feldes beizubehalten, charakterisieren. Superparamagnetische Stoffe können magnetische Suszeptibilitäten aufweisen, die beinahe so stark wie die von ferro-magnetischen Stoffen und weit höher als die von paramagnetischen Stoffen sind (Bean und Livingston, J. Appl. Phys., Suppl. to vol. 30, S. 1205 [1959]).

Ferromagnetismus und Superparamagnetismus sind eher die Eigenschaften von Gittern als von Ionen oder Gasen. Eisenoxide wie z.B. Magnetit und Gamma-Eisen(III)-oxid zeigen ferromagnetische oder superparamagnetische Eigenschaften je nach Größe der Kristalle, aus denen sich der Stoff zusammensetzt, wobei größere Kristalle ferromagnetisch sind (G. Bate, in: Ferromagnetic Materials, Vol. 2, Wolfarth [Hrsg.], S. 439).

So, wie sie allgemein eingesetzt werden, verändern superparamagnetische und ferromagnetische Stoffe das MR-Bild durch Reduzierung von  $T_2$ , was bewirkt, daß das Bild dunkler wird. Nach der Verabreichung durch Injektion sammeln sich diese magnetischen Stoffe in den Zielorganen oder -geweben an und lassen die Organe oder Gewebe, in denen sie sich angesammelt haben, dunkler erscheinen. Anormalen Leberumfängen, wie z.B. Tumoren, fehlt es an der Fähigkeit, die magnetischen Stoffe aufzunehmen, und sie erscheinen vor dem normalen Hintergrundgewebe heller als es ohne Kontrastmittel der Fall wäre.

### 2.3 Superparamagnetische Stoffe

Wie oben bereits erwähnt, besitzen superparamagnetische Stoffe einige Eigenschaften von paramagnetischen Stoffen und einige Eigenschaften von ferromagnetischen Stoffen. Wie die paramagnetischen Stoffe verlieren die superparamagnetischen Stoffe sehr schnell ihre magnetischen Eigenschaften bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes; sie besitzen ebenso die hohe magnetische Suszeptibilität und die kristalline Struktur, die man bei ferromagnetischen Stoffen vorfindet. Eisenoxide wie z.B. Magnetit oder Gamma-Eisen(III)-oxid zeigen superparamagnetische Eigenschaften, wenn der Kristalldurchmesser erheblich unter den Kristalldurchmesser von rein ferromagnetischen Stoffen fällt.

Im Falle von kubischem Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) liegt diese Grenze bei einem Kristalldurchmesser von ca.  $300 \cdot 10^{-10} \text{ m}$  (300 Angström) (Dunlop, J. Geophys. Rev. 78, S. 1780 [1972]). Eine ähnliche Grenze gilt für Gamma-Eisen(III)-oxid (Bare in: Ferromagnetic Materials, Vol. 2, Wohlfarth [Hrsg.] [1980], S. 439). Da Eisenoxidkristalle im allgemeinen nicht in einer einheitlichen Größe vorliegen, liegt die Durchschnittsgröße von rein ferromagnetischen Eisenoxiden erheblich über der Grenze von  $300 \cdot 10^{-10} \text{ m}$  (300 Angström). Wird beispielsweise Gamma-Eisen(III)-oxid als ferromagnetischer Stoff bei der Magnetaufzeichnung eingesetzt (z.B. Pfizer Corp. Pf2228), dann sind die Partikel nadelartig mit einer Länge von ca.  $0,35 \cdot 10^{-6} \text{ m}$  (0,35 Mikron) und einer Stärke von  $0,06 \times 10^{-6} \text{ m}$  (0,06 Mikron). Andere ferromagnetische Teilchen zur Datenaufzeichnung sind zwischen  $0,1$  und  $10 \cdot 10^{-6} \text{ m}$  (0,1 und 10 Mikron) lang (Jorgensen, The Complete Handbook of Magnetic Recording, S. 35 [1980]). Für einen gegebenen Kristalltyp weisen Zubereitungen von rein ferromagnetischen Teilchen durchschnittliche Durchmesser auf, die um ein Vielfaches über den Zubereitungen von superparamagnetischen Teilchen liegen.

Die theoretischen Grundlagen für Superparamagnetismus sind ausführlich von Bean und Livingston beschrieben worden (J. Applied Physics, Supplement to volume 30, S. 1205 [1959]). Grundlegend für die Theorie für superparamagnetische Stoffe ist der destabilisierende Temperatureinfluß auf den Magnetismus dieser Stoffe. Wärmeenergie verhindert die Ausrichtung der in superparamagnetischen Stoffen vorliegenden magnetischen Momente. Nach der Entfernung eines angelegten äußeren magnetischen Feldes bestehen die magnetischen Momente superparamagnetischer Stoffe zwar weiter, doch bewegen sich diese Momente so schnell, daß sie ein zufällig ausgerichtetes oder ungeordnetes magnetisches Moment und somit kein reines Magnetfeld hervorrufen. Bei den Temperaturen von biologischen Systemen und unter dem Einfluß der magnetischen Felder von Magnetresonanz-Bilderzeugungsgeräten erweisen sich superparamagnetische Stoffe weniger magnetisch als ihre ferromagnetischen Gegenstücke. So haben Berkowitz et al. (J. App. Phys. 39, S. 1261) [1968]) beispielsweise einen abgeschwächten Magnetismus bei kleinen superparamagnetischen



Eisenoxiden unter erhöhten Temperaturen festgestellt. Dies kann zum Teil eine Erklärung dafür sein, warum sich Forscher auf dem Gebiet der Kernspintomographie mit ferromagnetischen Stoffen als Kontrastmittel befaßt haben, ausgehend von der Theorie, daß die Wirksamkeit eines Stoffes in bezug auf die Dämpfung von  $T_2$  umso größer sein müßte, umso stärker die Magnetkraft des Stoffes pro Gramm ist (Drain, Proc. Phys. Soc. 80, S. 1380 [1962]; Medonca-Dias und Lauterur, Mag. Res. Med. 3, S. 328 [1986]).

## 2.4 Superparamagnetische Lösungen auf Wasserbasis

Seit einiger Zeit weiß man, daß sich superparamagnetische Teilchen zu magnetischen Fluids, Ferrofluids genannt, verarbeiten lassen (siehe Kaiser und Miskolczy, J. Appl. Phys. 41 3, S. 1064 [1970]). Ein Ferrofluid ist eine Lösung sehr feiner magnetischer Partikel, die durch Brownsche Bewegung daran gehindert werden, sich abzusetzen. Um eine Klumpung der Teilchen durch van-der-Waals'sche Anziehungskräfte zu verhindern, sind die Teilchen auf irgendeine Weise beschichtet. Wird ein äußeres magnetisches Feld angelegt, dann wird die Magnetkraft auf das Gesamtvolumen der Flüssigkeit übertragen und reagiert das Ferrofluid als ein Fluid, d.h. die magnetischen Teilchen trennen sich nicht von dem Lösungsmittel.

Ein anderer Ansatz zur Synthese von magnetischen Verbindungen auf Wasserbasis wird von Gable et al. vorgestellt (US-Patent Nr. 4.001.288). In diesem Patent wird beschrieben, daß Magnetit mit einer Hydroxycarboxylsäure zur Reaktion gebracht werden kann, um einen wasserlöslichen Komplex zu bilden, der ein ferromagnetisches Verhalten sowohl in fester Form als auch in Lösung zeigt.

#### 2.4.1 Schwierigkeiten bei der Bearbeitung von wäßrigen Lösungen von superparamagnetischen Stoffen

Ansätze für die Synthese von wäßrigen Fluids von superparamagnetischen Eisenoxiden implizieren oftmals das Umhüllen der Eisenoxidkristalle mit einem Polymer oder mit Surfactanten in dem Bemühen, die eine Verklumpung fördernden Anziehungskräfte zwischen den Kristallen auszuschalten. In vielen Fällen jedoch wird das Oxid nicht vollständig von dem Polymer umgeben, und das resultierende Material behält viel von der Neigung zur Verklumpung oder Ansammlung bei, die für das unbeschichtete Eisenoxid charakteristisch ist. Die Neigung zur Verklumpung und andere besondere Eigenschaften von Eisenoxidlösungen stellen ein Hemmnis dar für die im Rahmen der pharmazeutischen Herstellung erforderlichen Maßnahmen zur Aufbereitung dieser Lösungen.

Die Herstellung einer magnetischen pharmazeutischen Lösung wie z.B. eines Kontrastmittels zur Kernspintomographie erfordert eine äußerst stabile Lösung, damit bestimmte Arbeitsschritte, die im Rahmen der Pharmaherstellung üblich sind, durchgeführt werden können. Lösungsstabilität ist definiert als die Beibehaltung der Größe des magnetischen Stoffes in Lösung; in einer instabilen Lösung verklumpt der Stoff oder sammelt sich an. Solche Veränderungen der Größe eines magnetischen Stoffes ändern auch dessen Biodistribution nach einer Verabreichung durch Injektion, eine nicht tolerierbare Situation im Falle eines Kontrastmittels zur Kernspintomographie. Ein hoher Stabilitätsgrad ist erforderlich, um allgemeine, mit der pharmazeutischen Herstellung verbundene Arbeitsgänge durchführen zu können, wie z.B. Dialyse, Konzentration, Filtration, Zentrifugation, Lagerung von Konzentraten vor dem Abfüllen in Flaschen sowie Langzeitlagerung nach dem Abfüllen in Flaschen. Besondere Probleme stellen sich durch die Notwendigkeit, wäßrige Metalloxidlösungen, z.B. eine Lösung von Eisenoxid, für pharmazeutische Zwecke zu sterilisieren.

Hinzu kommt, daß konzentrierte Lösungen von wäßrigen superparamagnetischen Stoffen selbst dann nicht durch Filtration sterilisiert werden können, wenn die Lösung aus Stoffen besteht, die kleiner als die Poren des Filters sind. Dieses Phänomen hängt mit der Konzentration der Lösung zusammen, da verdünnte Lösungen filtersterilisiert werden können. Filtersterilisiertes verdünntes Material kann wieder konzentriert und in sterilen Flaschen abgegeben werden, jedoch bieten solche Arbeitsgänge viele Möglichkeiten für eine erneute Kontamination des Produkts. Das Autoklavieren von Lösungen superparamagnetischer Stoffe nach dem Abfüllen in Flaschen wird bevorzugt, da die Sterilisation nach dem endgültigen Abfüllen in Flaschen erreicht wird und somit geringe Chancen für eine Kontamination des Endprodukts gegeben sind. Das Autoklavieren impliziert, luftdicht verschlossene Lösungen einer Wärmebehandlung mit 121 °C für die Dauer von 30 Minuten zu unterziehen. Solche extremen Temperaturen lösen eine Ansammlung oder Verklumpung der superparamagnetischen Oxide aus, was sie als Impfschubstanz unbrauchbar macht.

## 2.5 Paramagnetische Eisen(III)-oxide

Paramagnetische Eisenoxide oder Eisen(III)-oxide werden derzeit zur Behandlung von Anämie unter zahlreichen Handelsnamen wie z.B. Imferon<sup>(R)</sup> eingesetzt. Gelöst in einer wäßrigen Lösung können diese Stoffe als  $\text{FeO}:\text{OH}$  dargestellt und als Eisen(III)-oxyhydroxide bezeichnet werden. Sie sind paramagnetisch und üben, wenn überhaupt, nur sehr geringe Protonenrelaxivitätswirkungen aus. Sie sind stabil, lassen sich den bereits genannten Arbeitsgängen der pharmazeutischen Herstellung unterziehen und sind im Handel als Arzneistoffe erhältlich, die im Rahmen der Behandlung von Anämie eingesetzt werden.

### 3 BEGRIFFE UND IHRE BEDEUTUNG

Der Begriff "biologisch abbaubar" im Zusammenhang mit den Stoffen dieser Erfindung bedeutet, daß der Stoff von dem Subjekt innerhalb von 30 Tagen oder weniger metabolisiert und/oder ausgeschieden wird; in Verbindung mit superparamagnetischen Eisenoxiden ist dieser Begriff weiter definiert und bedeutet, daß der Stoff in das Hämoglobin eines Subjekts innerhalb von 30 Tagen oder weniger nach der Verabreichung inkorporiert wird.

Der Begriff "Blockierungsmittel" oder "Blocker" bezeichnet definitionsgemäß eine Substanz, die bei parenteraler Verabreichung an ein Subjekt konkurrierend an die Rezeptoren der Zellen des reticulo-endothelialen Systems ankoppelt, die Kernspintomographie-Kontrastmittel erkennen und binden.

Der Begriff "superparamagnetisches Fluid" bezeichnet definitionsgemäß ein nach den Verfahren gemäß Abs. 6.3 der vorliegenden Unterlage hergestelltes Metalloxydfluid, das die in Abs. 6.4 der vorliegenden Unterlage beschriebenen Eigenschaften besitzt.

### 4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Ein Gegenstand dieser Erfindung ist die Herstellung von Fluids, die superparamagnetische Metalloxydpartikel enthalten, die Merkmale besitzen, die sie besonders geeignet für den Einsatz als Kontrastmittel im Rahmen von In-vivo-Kernspintomographieverfahren machen. Es ist insbesondere ein Gegenstand dieser Erfindung, Fluids anzubieten, die Partikel enthalten, die sich leicht verabreichen lassen, die einen erheblichen Einfluß auf das erstellte Bild ausüben und die sich in vivo zu bestimmten Organen oder Geweben hin verteilen. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist, Mittel anzubieten, durch die die Partikel, die in diesen Fluids enthalten sind, in vivo zu bestimmten Zielorganen oder -geweben hingelenkt werden können.

Die Fluids der vorliegenden Erfindung erfüllen all diese Ziele. Diese Fluids sind im lebenden Organismus stabil, lassen sich für einen In-vivo-Einsatz leicht verarbeiten und überwinden die Probleme der Toxizität und übertrieben langen Retention im Subjekt (d.h. sie sind biologisch abbaubar). Bemerkenswerterweise hat man festgestellt, daß die Fluids der hier beschriebenen Erfindung recht stabil sind und sich sehr gut vor ihrer Verwendung herstellen und lagern lassen. Außerdem üben die Partikel, die in diesen Fluids enthalten sind, einen größeren Einfluß auf  $T_1$  aus als ferromagnetische und paramagnetische Stoffe, so daß sie ein gut aufgelöstes Negativbild eines In-vivo-Zielorgans oder -gewebes liefern.

Darüber hinaus hat man überraschenderweise festgestellt, daß die in diesen Fluids enthaltenen Teilchen äußerst wünschenswerte In-vivo-Retentionszeiten aufweisen, d.h. sie bleiben ausreichend lange intakt, um die Aufnahme des Bildes zu gestatten, und sind letztendlich doch biologisch abbaubar. Bemerkenswerterweise dienen Teilchen auf Eisenbasis, sobald sie einmal abgebaut sind, als eine Quelle für alimentäres Eisen. Außerdem sind die Teilchen ausreichend klein, um sich frei durch das Gefäßsystem des Subjekts bewegen zu können und um schnell von dem darzustellenden Organ und/oder Gewebe resorbiert werden zu können; dieses bietet ein Maximum an Spielraum bei der Auswahl von Applikationsrouten und Endzielen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die hier beschriebenen superparamagnetischen Teilchen die mit der Verwendung von ferromagnetischen und paramagnetischen Stoffen als MR-Kontrastmittel einhergehenden Probleme überwinden. Genauer gesagt, die superparamagnetischen Teilchen sind, weil sie kleiner als ferromagnetische Teilchen sind, eher in der Lage, einer Aufnahme durch die Reticuloendothelzellen des Subjekts zu entgehen, und können effektiver und gezielter auf anders gelegene Organe und Gewebe innerhalb des Körpers ausgerichtet werden. Hinzu kommt, daß die superparamagnetischen Metalloxidteilchen, weil sie kleiner als ferromagnetische Teilchen sind, eine größere Oberfläche je Masseneinheit aufweisen und sich leichter und schneller durch

chemische oder metabolische Prozesse abbauen lassen. Die hier eingesetzten superparamagnetischen Teilchen jedoch werden, da sie größer als paramagnetische Ione sind, nicht so schnell in dem Zielorgan oder -gewebe metabolisiert, als daß eine angemessene Bilddarstellung verhindert würde.

Die superparamagnetischen Fluids werden nach einem Vierstufenverfahren aus einem Gemisch aus zweiwertigen und dreiwertigen Salzen, wie z.B.  $\text{FeCl}_2$  und  $\text{FeCl}_3$ , hergestellt. Dieses Verfahren erlaubt außerdem die Inkorporation anderer, eisenähnlicher Metalle (wie z.B. Kobalt [Co] und Mangan [Mn]) in die Fluids, indem einige der zweiwertigen Eisensalze gegen zweiwertige Salze dieser Metalle ausgetauscht werden. Bei diesem Prozeß werden die Salze in Base ausgefällt, um entsprechende Metalloxidpartikel zu bilden. Diese Partikel werden dann durch Beschallen des Gemischs mit Ultraschall dispergiert und oxidiert; als Ergebnis liegen, bemerkenswerterweise, superparamagnetische Eisen(III)-oxyhydroxid-Teilchen vor. Unlösliche Teilchen werden anschließend durch Zentrifugation entfernt, und das Endfluid wird in Gegenwart eines neutralen oder alkalischen Puffers, der für eine Verwendung in vivo geeignet ist, dialysiert.

In einer bevorzugten Ausführungsart handelt es sich bei dem Salzgemisch um  $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$  in einem Verhältnis von 1 : 2, was zu der Bildung von Eisen(III)-oxyhydroxid-Partikeln führt, und bei dem Puffer um 10 mM Ammoniumnitrat, pH-Wert 8,2. Das resultierende superparamagnetische Fluid ist hochstabil und hält einer Behandlung im Autoklaven stand.

Die superparamagnetischen Fluids zeigen einige der magnetischen Eigenschaften von superparamagnetischen Ferrofluids (z.B. können die in ihnen enthaltenen Partikel nicht durch magnetische Manipulation entfernt werden). Die superparamagnetischen Teilchen, wenn in diesen Fluids gelöst, streuen nicht sichtbares Licht, was darauf hinweist, daß die einzelnen Metalloxidpartikel recht klein sind (ihr Durchmesser liegt im allgemeinen zwischen 50 und  $4000 \cdot 10^{-10}$  m).

Die superparamagnetischen Teilchen dieser Erfindung liegen in dem Massenfluid als ionische Kristalle vor und besitzen sowohl ionische als auch kristalline Eigenschaften. Gemein mit Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) und Gamma-Eisen(III)-oxid (Gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ist ihnen eine hohe magnetische Suszeptibilität. Gemein mit ionischen Formen von Eisenoxid, den sogenannten Eisen(III)-oxyhydroxiden, ist ihnen die Fähigkeit, eine Retention von Anionen zu bewirken. Das Gegenion der Kristalle kann irgendeines aus einer Reihe von organischen Anionen sein.

Die superparamagnetischen Teilchen in den Fluids enthalten kristalline Kerne, deren Durchmesser zwischen ca  $50 \cdot 10^{-10}$  m und  $500 \cdot 10^{-10}$  m liegen können. Diese Kerne können wahlweise mit einem Überzug versehen sein, der aus einem Polysaccharid, einem Protein, einem Polypeptid, einem Organosilan oder einer Zusammensetzung daraus bestehen kann. Zum Beispiel kann ein Polysaccharidüberzug Dextran mit verschiedenen Molekulargewichten und kann ein Proteinüberzug Rinderserumalbumin oder humanes Serumalbumin enthalten. Mit Überzügen versehen kann der Partikelgesamtdurchmesser zwischen ca.  $50 \cdot 10^{-10}$  m und  $5.000 \cdot 10^{-10}$  m liegen.

Diese Polymerüberzüge dienen als Grundlage, an der biologische Moleküle angekoppelt werden können. Biologische Moleküle können dazu verwendet werden, die superparamagnetischen Metalloxidpartikel zu dem gewünschten Ziel hinzulenken und werden vorzugsweise von dem Zielorgan oder -gewebe erkannt und gebunden. Geeignete Biomoleküle sind u.a. Proteine, Polysaccharide, Hormone, Antikörper, usw..

Der Verwendung von superparamagnetischen Teilchen mit einer Größe im Bereich unter einem Mikron kommt besondere Bedeutung zu, wenn die Verabreichung auf intravaskulärem Wege erfolgt, da sich diese Teilchen in dem Gefäßsystem des Subjekts frei bewegen können, weil sie klein genug sind, um das Kapillarnetz zu passieren. Derartige Teilchen können daher nach ihrer intravaskulären Verabreichung zu Zielorganen oder -geweben befördert werden bei minimalem Aufwand und mit minimaler Verzögerung.

Nach der Verabreichung sammeln sich die in den Fluids enthaltenen Teilchen in dem Zielorgan oder -gewebe an und üben eine starke Kontrastwirkung aus, womit sie die Aufnahme eines Bildes gestatten. Die Teilchen bewirken primär eine Verlängerung der Relaxationszeit  $T_2$ , jedoch wirken sie sich auch auf  $T_1$  aus (wenn auch nicht so stark).

Werden die Teilchen beispielsweise intravaskulär verabreicht (z.B. intravenös oder intraarteriell), dann werden sie selektiv verteilt zu reticuloendothelialen Organen einschließlich Leber, Milz, Lymphknoten, Knochenmark und, in geringerem Umfang, Lunge. Werden die Teilchen jedoch über den Magendarmtrakt verabreicht, z.B. oral, durch Intubation oder durch Einlauf, dann können sie als Kontrastmittel für die Organe und Gewebe des Magendarmtrakts genutzt werden.

In einer Verkörperung kann ein Fluid, das dextranbeschichtete Eisenoxidpartikel enthält, in den Blutkreislauf eines Subjekts injiziert werden, und die Teilchen sammeln sich in der Leber an. Diese Teilchen werden von den Reticuloendothelialzellen der Leber auf dem Wege der phagozytischen Aufnahme resorbiert; ein besonderer Vorzug dieser Art der Aufnahme ist der, daß durch phagozytische Aufnahme resorbiertes Eisen sehr viel langsamer über den Stoffwechsel abgebaut und aus der Leber ausgeschieden wird (jedoch nicht so langsam, um unerwünscht lange Retentionszeiten zu verursachen) als dem derzeitigen Stand der Technik entsprechende paramagnetische Ione. Außerdem können die dextranbeschichteten Teilchen vorzugsweise von gesunden Zellen resorbiert werden und werden in geringerem Maße von kanzerogenen Zellen (Tumorzellen) aufgenommen. Diese bevorzugte Aufnahme steigert den Kontrast zwischen gesundem und kanzerogenem Gewebe und bietet eine bessere Wiedergabeschärfe der Lage des Tumors auf dem Bild.



## 5 KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

Die ABBILDUNG 1 zeigt eine Grafik, in der die Auswirkungen von ferromagnetischen Kontrastmitteln im Vergleich zu denen von superparamagnetischen Kontrastmitteln auf  $T_2$  dargestellt sind;

die ABBILDUNG 2 zeigt einen Satz von fünf mit einem MR-Darstellungsgerät von Technicare gewonnenen In-vivo-MR-Bildern einer kanzerogenen Rattenleber;

die ABBILDUNGEN 2A und 2B wurden ohne Kontrastmitteleinsatz erstellt und wurden mit verschiedenen Einstellungen des Geräts aufgenommen;

die ABBILDUNGEN 2C und 2D wurden nach der intravenösen Verabreichung des in Beispiel 6.1 hergestellten dextranbeschichteten Teilchens in einer Dosierung von 0,5 mg/kg erstellt; der Tumor ist deutlich zu erkennen;

die ABBILDUNG 2E entspricht dem in ABB. 2C wiedergegebenen Bild und zeigt den Tumor in Hervorhebung durch ein Fadenkreuz;

die ABBILDUNG 3 zeigt in grafischer Darstellung die prozentuale (%)  $T_2$ -Reduktion in Leber- und Milzgewebe für drei verschiedene Dosierungen eines unbeschichteten superparamagnetischen Teilchens als eine Funktion der Zeit nach Verabreichung;

die ABBILDUNG 4 zeigt Hysteresekurven für paramagnetische, ferromagnetische und superparamagnetische Eisenoxide;

die ABBILDUNG 5 zeigt die Auswirkungen des Autoklavierens auf superparamagnetische Fluids, die unterschiedliche Citrat-Konzentrationen enthalten;

die ABBILDUNG 6 zeigt eine Skizze des in Beispiel 7.10 eingesetzten Geräts; und

die ABBILDUNG 7 zeigt in grafischer Darstellung das Verhalten von  $T_2$  von Rattenblut als eine Funktion der Zeit nach der Injektion eines dextranbeschichteten superparamagnetischen Eisenoxidpartikels und ohne den Einsatz eines Blockierungsmittels.

## 6 AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

### 6.1 Herstellung von beschichteten superpara- magnetischen Eisenoxidpartikeln

Die Synthese von superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln für eine Verwendung als MRI-Kontrastmittel erfolgt durch das Mischen von Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen mit einer Base, wodurch man ein schwarzes, magnetisches Eisenoxid erhält. Aus solchen Ausfällungen gehen Kristalle hervor, denn wenn man das Material Röntgen-Diffraktionsanalysen unterzieht, zeigt sich eine Fernbereichsordnung. Ein Durchmesser von ca.  $50 \text{ bis } 300 \cdot 10^{-10} \text{ m}$  (ca. 50 bis 300 Angström) wurde für solche Kristalle ermittelt, obwohl die Kristalle einen Durchmesser zwischen ca.  $50 \cdot 10^{-10}$  und  $500 \cdot 10^{-10}$  (ca. 50 bis 500 Angström) aufweisen können. Die Eisenoxide weisen entsprechend große Oberflächen auf, größer als  $75 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Das Vorhandensein von Eisen(II)-Salzen vor dem Zusetzen von Base gewährleistet die Bildung eines schwarzen, kristallinen, magnetischen Eisenoxids. Ohne das Eisen(II)-ion entstehen paramagnetische Eisen(III)-oxid-Gele (nichtkristalline Stoffe) (wie z.B. in US-Patent Nr. 2.885.393 beschrieben). Das vorhandene zweiwertige Eisen, das für die Bildung des superparamagnetischen Stoffes so wesentlich ist, läßt sich entfernen, indem man den Stoff Oxidationsbedingungen unterzieht. Die Oxidation des Eisens zum Zwecke der Bildung eines Eisen(III)-oxids nach der Kristallbildung ändert nichts an der Eignung des Materials als ein Kontrastmittel zur Kernspintomographie oder am Superparamagnetismus.

Bei der Lektüre dieser ausführlichen Beschreibung muß stets klar sein, daß die Verwendung von superparamagnetischen Eisenoxiden als MR-Kontrastmittel nur eine Verkörperung der hier beschriebenen Erfindung ist und daß superparamagnetische Oxide von anderen magnetischen Stoffen wie z.B. von Kobalt oder Gadolinium an die Stelle von Eisenoxiden treten können.

Es gibt zwei grundsätzliche Verfahrensweisen, beschichtete superparamagnetische Eisenoxidpartikeln herzustellen, die für die Kernspintomographie geeignet sind.

1. Synthese von Eisenoxid durch Ausfällung in der Gegenwart von Polymeren wie Dextran oder Polyglutaraldehyd oder einer anderer Substanz. Zu diesen Synthesarten gehören diejenigen, die von London et al., US-Patent Nr. 2.870.740, Molday, US-Patent Nr. 4.452.773, Cox et al., Nature 208, S. 237 (1965) und Rembaum, US-Patent Nr. 4.267.234 beschrieben worden sind und die allesamt durch diese Bezugnahme Bestandteil der vorliegenden Unterlage werden.

2. Synthese des Eisenoxids durch Ausfällung mit anschließender Beschichtung mit einem Polymer wie Dextran oder einer anderer Substanz. Dieser Syntheseweg wird beschritten von Elmore, Phys. Rev. 54, S. 309 (1938) und Ogushi et al., J. Mag. Res. 29, S. 599 (1978); beide Unterlagen werden durch diese Bezugnahme Bestandteil der vorliegenden Unterlage.

Mit Proteinen und Dextranen scheint die Synthese des Oxids in der Gegenwart des Polymers eine feste Verbindung zwischen dem Polymer und dem Oxid zu bewirken. Wird zuerst das Oxid hergestellt und dieses anschließend einem Protein oder Dextran ausgesetzt, so geht daraus ein beschichtetes Teilchen hervor, bei dem der Überzug an der Partikeloberfläche durch relativ schwache Adsorptionsphänomene festgehalten wird. Wenn das Oxid und das adsorbierte Polymer jedoch eine Veränderung, Lagerung und Verabreichung durch Injektion in Gegenwart eines nichtadsorbierten Polymers erlauben, dann stellt der geringe Bindungsgrad zwischen dem Oxid und dem Polymer kein Problem dar. Werden beispielsweise die Teilchen nach Abs. 6.1.3

(unbeschichtet) in einem Verhältnis von 1 : 1 in einem neutralen Puffer, der 1 % (Gew./Vol.) humanes Serumalbumin enthält, verdünnt, dann wird Protein in beträchtlichem Umfang an der Oxidoberfläche anhaften. Dieses Ansatz für die Herstellung eines albuminbeschichteten magnetischen Teilchens ist ein gangbarer Weg für ein Kontrastmittel. Das mit humanem Serumalbumin beschichtete Teilchen (plus humanem Serumalbumin in Lösung) läßt sich einem Subjekt injizieren, und das in Lösung befindliche humane Serumalbumin vermischt sich mit dem im Serum enthaltenen humanem Serumalbumin. Wenn Teilchen nach diesem Ansatz hergestellt werden, dann läßt sich das lose gebundene humane Serumalbumin durch Behandlungen z.B. mit einer mittleren Temperatur (50°C) oder einem starken Salz (1 M NaCl) entfernen.

Bei den Beschichtungsverfahren handelt es sich um allgemeine Verfahren, die sich mit einer Vielzahl von physiologisch annehmbaren Proteinen und Kohlenhydraten, insbesondere mit solchen mit einem Molekulargewicht zwischen ca. 5.000 und ca. 250.000 Dalton, durchführen lassen. Andere Polymerbeschichtungen sind u.a. Albumin/Dextran-Verbindungen, Ficoll, Dextrin, Stärke, Glycogen und Polyethylenglycol.

#### 6.1.1 Herstellung von polysaccharidbeschichteten Teilchen

Polysaccharidbeschichtete superparamagnetische Eisenoxidpartikel (mit einem Durchmesser von ca. 10 bis ca. 5.000 Angström), die sich als MR-Kontrastmittel eignen, werden in einem Einstufenverfahren nach dem Verfahren von Molday (US-Patent Nr. 4.452.773) hergestellt, das durch diese Bezugnahme Bestandteil der vorliegenden Unterlage wird. In einer bevorzugten Verkörperung werden dextranisierte zweiwertige ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und dreiwertige ( $\text{Fe}^{3+}$ ) Eisensalze, z.B.  $\text{FeCl}_2$  und  $\text{FeCl}_3$ , aus einer wäßrigen Lösung, die ein Gemisch aus den Eisensalzen und Dextran (dessen Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton liegen kann) enthält, ausgefällt durch das tropfenweise Zusetzen (bis zu

pH 10) von basischem Ammoniumhydroxid bei 60° - 65°C; die zu großen Teilchen werden durch anschließendes 15-minütiges Zentrifugieren mit 1.500 x g entfernt und sodann weggeworfen. Die verbleibenden Teilchen werden in Gegenwart von destilliertem Wasser dialysiert und können durch Ultrafiltration konzentriert werden. Ein ungebundenes Dextran kann durch Gel-Filtrations-Chromatographie in einem Chlorid / Acetat-Puffer entfernt werden.

Das Verhältnis zwischen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  wird vorzugsweise in einer Größenordnung von ca. 2 : 1 gehalten, es kann jedoch in einem Bereich von ca. 0,5 : 1 und ca. 4,0 : 1 abgeändert werden, ohne daß sich dies wesentlich auf die Produktqualität und den Wirkungsgrad als Kontrastmittel niederschlägt.

Es können auch andere Basen als Ammoniumhydroxid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) eingesetzt werden, jedoch wird  $\text{NH}_4\text{OH}$  bevorzugt, weil das Ammoniumion eine geringfügig dispergierende Wirkung auf Eisenoxide ausübt, was die Ausbeute erhöht.

Wie bereits erwähnt, können verschiedene magnetisch aktive Metalle, insbesondere Co und Mn, an die Stelle von Fe treten, ohne daß dies den Wirkungsgrad der Teilchen als Kontrastmittel in irgendeiner Weise beeinträchtigt. Die Verwendung von anderen Polysacchariden wie z.B. Stärken, Glycogen oder Dextrinen wird ebenso erwogen.

#### 6.1.2 Herstellung von proteinbeschichteten Teilchen

Proteinbeschichtete superparamagnetische Eisenoxidpartikel werden in einem Einstufenverfahren ähnlich dem Verfahren von Molday (US-Patent Nr. 4.452.733) hergestellt. Die proteinbeschichteten Teilchen lassen sich wie die dextranbeschichteten Teilchen herstellen, wobei die Eisensalze (z.B.  $\text{FeCl}_2$  und  $\text{FeCl}_3$ ) und das Protein in Wasser gelöst werden und die beschichteten Eisenoxidpartikel durch tropfenweises Zusetzen einer Base ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) bis Erreichen eines pH-Wertes von 10 ausgefällt werden. In einer alternativen Verkörperung kann das Protein in der Base gelöst und kann eine wäßrige Lösung der Eisensalze

tropfenweise zugegeben werden, um ein beschichtetes Teilchen zu bilden.

Bei beiden Verfahren werden die übergroßen Teilchen anschließend durch Zentrifugation mit  $1.500 \times g$  gesammelt und werden die verbleibenden Teilchen einer Dialyse gegen destilliertes Wasser und einer anschließenden Ultrafiltration unterzogen. Etwaiges ungebundenes Protein kann durch Gel-Filtrations-Chromatographie in einem Chlorid/Acetat-Puffer entfernt werden.

Wie im Falle der polysaccharidbeschichteten Teilchen können sowohl die Zusammensetzung des Beschichtungsmaterials als auch das  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Verhältnis (ca. 2 : 1) von ca. 0,5 : 1 bis ca. 4 : 1 verändert werden, ohne daß dies den Wirkungsgrad dieser Teilchen als Kontrastmittel beeinträchtigt.

Wie bereits erwähnt, können verschiedene magnetisch aktive Metalle, insbesondere Co und Mn, an die Stelle von Fe treten, ohne daß dies den Wirkungsgrad der Teilchen als Kontrastmittel in irgendeiner Weise beeinträchtigt.

### 6.1.3 Herstellung von unbeschichteten Teilchen

Unbeschichtete paramagnetische Eisenoxidpartikel werden hergestellt durch Mischen einer wäßrigen Lösung von Eisen(III)-chlorid ( $\text{FeCl}_3$ ) mit Eisen(II)-chlorid ( $\text{FeCl}_2$ ) in HCl und Ausfällen in 0,7-molarem wäßrigen Ammoniak. Die basische Ausfällung bietet einen doppelten Vorteil, indem die Base mit den Eisenoxiden reagiert und unbeschichtete superparamagnetische Eisenoxidpartikel bildet. Das Präzipitat (eine galertartige Substanz) wird dann durch Zentrifugation oder Anlegen eines äußeren magnetischen Feldes gesammelt; dem schließt sich eine Dekantierung der flüssigen Phase an.

Das Gel wird dann zwecks Bildung eines Dispersoids peptisiert durch Mischen mit entweder 1-molarem wäßrigem Tetramethylammoniumhydroxid (zwecks Bildung eines basischen Dispersoids) oder 2-molarer wäßriger Perchlorsäure (zwecks Bildung eines sauren

Dispersoids) und anschließender Zentrifugation und Redispersion in Wasser. Die so hergestellten Dispersoide zeigen beide eine bemerkenswerte Stabilität und enthalten wegen ihrer gallertartigen Natur keine größeren Feststoffteilchen. Die Gegenionen, entweder Tetramethylammoniumhydroxid oder Perchlorat, werden in basischen bzw. sauren Medien zugegeben und verhindern so eine Komplex-Koagulation in Lösung; die Teilchen (Eisenoxid/Gegenion-Komplexe) lassen sich wiederholt ausfällen und erneut in Lösung dispergieren und behalten diese Eigenschaft bei.

In einer alternativen Verkörperung können die Teilchen eher durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes als durch Zentrifugation gesammelt werden. Der resultierende magnetische Kuchen wird dann durch das entsprechende Gegenion peptisiert.

Das Verhältnis von  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  wird vorzugsweise in der Größenordnung von ca. 2 : 1 gehalten, es kann jedoch zwischen ca. 0,5 : 1 und ca. 4 : 1 verändert werden. Eine Reduzierung des Verhältnisses wird größere, eine Erhöhung des Verhältnisses wird kleinere Teilchen hervorbringen. Bei Anwendung eines Verhältnisses von 2 : 1 und Einsatz von 0,7 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  liegt die erzeugte durchschnittliche Teilchengröße bei ca. 1.200 Angström, gemessen nach dem Lichtstreuemeßverfahren.

## 6.2 Verwendung der Teilchen als Kontrastmittel zur Kernspintomographie

Die oben beschriebenen magnetischen Stoffe lassen sich als kontrastverstärkende Mittel zur In-vivo-Kernspintomographie einsetzen. In einer Ausführungsart werden die Teilchen in einem geeigneten Injektionsmedium, z.B. in destilliertem Wasser oder normaler physiologischer Kochsalzlösung, oder in einem anderen auf dem Fachgebiet bekannten physiologisch annehmbaren Träger dispergiert, um ein Dispersoid zu bilden, das in das Gefäßsystem des Subjekts durch intravenöse Injektion eingebracht wird. Die Teilchen

werden dann durch das Gefäßsystem zu dem Zielorgan hintransportiert, wo sie aufgenommen werden.

Bei intravaskulärer Verabreichung werden die Teilchen bevorzugt von Organen aufgenommen, die normalerweise die Aufgabe haben, das Blut von Verunreinigungen zu reinigen, so insbesondere von der Leber, der Milz und den Lymphknoten, sowie von den anderen Organen, die dazu neigen, solche Verunreinigungen zu sammeln, so insbesondere von dem Knochengewebe und dem neuralen Gewebe und zu einem gewissen Grad von der Lunge. In jedem dieser Organe und Gewebe erfolgt die Aufnahme in die Reticulendothelialzellen durch Phagozytose, wobei die Partikel in die einzelnen Zellen in membrangebundenen Bläschen (Vesikeln) eindringen; daraus ergibt sich eine längere Halbwertszeit in den Zellen, da diese membrangebundenen Teilchen nicht zur Verklumpung oder Ansammlung neigen (Ansammlungen werden sofort metabolisiert und aus dem Organ/Gewebe ausgeschieden). Andere Aufnahmemechanismen sind möglich, z.B. durch Pinozytose. Ebenso besteht die Möglichkeit, daß die anderen Zellen der Leber (Hepatozyten) die magnetischen Teilchen resorbieren.

Weil es kanzerogenen Zellen an der Fähigkeit zur phagozytischen Aufnahme mangeln kann, können die intravaskulär verabreichten Teilchen wertvolle Hilfsmittel bei der Diagnose von Krebs in den obengenannten Organen darstellen, da Tumore auf einem angefertigten Bild sofort erkennbar sind.

In einer anderen Verkörperung werden die Teilchen als Dispersoide in einem physiologisch akzeptablen Träger wie z.B. destilliertem Wasser über den Magendarmtrakt - umfassend die Speiseröhre, den Magen, den Dünndarm und den Dickdarm - entweder oral, durch Intubation oder per Einlauf in einem geeigneten Medium verabreicht. Die Teilchen werden bevorzugt von den Zellen des Trakts aufgenommen, insbesondere von den Darmzellen, und zeigen wie die intravaskulär verabreichten Teilchen Auswirkungen auf T<sub>2</sub> des Organs oder Gewebes. Auf diese Weise lassen sich Krebsgeschwüre und andere



zerstörerische Krankheiten des Verdauungssystems wie z.B. Geschwüre diagnostizieren und betroffene Bereiche lokalisieren.

Ungeachtet der Applikationsroute werden sich die Teilchen, sobald sie einmal verabreicht sind, rasch zu den Zielorganen verteilen und sich in diesen sammeln, und zwar im allgemeinen innerhalb einer halben bis einer ganzen Stunde.

In dem Organ verändern diese superparamagnetischen Teilchen die von dem MR-Darstellungsgerät erzeugten magnetischen Felder. Diese veränderten Felder wirken sich auf die magnetischen Eigenschaften der Wasserstoffkerne (Protonen) in benachbarten Molekülen aus; besonders betroffen ist die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$ . Dieser Parameter wird verkürzt, was eine Bildverdunklung bewirken kann. Somit wird der Kontrast zwischen solchen Bereichen, die die Teilchen schnell absorbieren, und solchen Bereichen, die sie langsam oder gar nicht absorbieren, verschärft.

Die Teilchen sind jedoch letztlich biologisch abbaubar, und das Eisen kann vom Körper zur Deckung des physiologischen Bedarfs mit verwertet werden. Die Auswirkungen auf den Kontrast fallen je nach Dosierung - wobei höhere Dosierungen eine Verlängerung der Auswirkungen bewirken - sowie je nach Organ, das abzubilden ist, unterschiedlich aus. Insbesondere in der Leber und in der Milz (die Eisen zur physiologischen Verwertung speichern) lassen sich die Wirkungen 14 Tage und länger nachweisen (siehe Abs. 7.6), häufig sogar 30 Tage lang.

Die Lokalisierung in diesen Organen, die Eisen zur letztendlichen Inkorporation in das Hämoglobin speichern, offenbart, daß die Eisenoxidpartikel letztlich als eine Quelle für metabolisierbares Eisen dienen und tatsächlich in das Hämoglobin der Subjekte inkorporiert werden. Diese Substanzen können daher im Rahmen der Behandlung von Anämie von Nutzen sein.

Die Unterschiede bezüglich der Parameterwerte werden rechnermäßig ausgewertet und zur Erzeugung eines Abbildes des betreffenden Organs herangezogen. In den Fällen, in denen, wie oben angeführt, eine

Aufnahme durch phagozytische Prozesse erfolgt (insbesondere in der Leber, der Milz, den Lymphknoten und dem Knochen- und neuralen Gewebe und zu einem gewissen Grad in der Lunge), wird dieses Abbild klar und deutlich zwischen kanzerogenem und gesundem Gewebe differenzieren, was die Lokalisierung eines Tumors gestattet. In anderen Organen und/oder bei der Diagnose von anderen Krankheiten werden Veränderungen der Beschichtung dieser Teilchen durch die Ankopplung von verschiedenen funktionellen Gruppen die Aufnahme durch das Organ oder die Zelle der Wahl stimulieren. So können beispielsweise gegen eine bestimmte Tumorzelle (z.B. ein Lungenkarzinom) gerichtete Antikörper an die Oberfläche eines beschichteten Teilchens gekoppelt werden, was die Aufnahme durch dieses Organ stimuliert, sofern eine solche Zelle vorhanden ist. Auf diese Weise kann das Verfahren als Mittel zur Diagnose zahlreicher Krankheiten dienen.

### 6.3 Herstellung von superparamagnetischen Fluids

Die als Kontrastmittel brauchbaren superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung werden vorzugsweise in einem Dreistufenverfahren hergestellt, das die nachgenannten Verfahrensschritte umfaßt: Bildung des superparamagnetischen Metalloxids; Oxidation und Dispersion dieses Oxids durch Beschallen mit Ultraschall; und Dialyse in Gegenwart eines Puffers. Dieser Prozeß bringt stabile biologisch abbaubare superparamagnetische Metalloxide hervor, die ihre Stabilität in erster Linie ihren Anionrückhalteeigenschaften verdanken. Diese Metalloxide können unbeschichtet sein oder mit organischen Beschichtungsstoffen verbunden werden. Jeder dieser Verfahrensschritte wird im folgenden gesondert erörtert.

### 6.3.1 Bildung des superparamagnetischen Metalloxiids

Die Bildung des superparamagnetischen Metalloxiids erfolgt durch Mischen der geeigneten Metallsalze mit einer Base. In einer bevorzugten Ausführungsart geschieht dies durch Mischen einer wäßrigen Lösung oder Suspension von zweiwertigen und dreiwertigen Eisensalzen ( $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ ) mit einer Base wie Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ). Zusätzlich können Metalle mit einer ähnlichen Struktur wie Eisen, z.B. Co und Mn, in das letztlich hervorgehende superparamagnetische Fluid inkorporiert werden durch Austausch eines gewissen Teils, vorzugsweise der Hälfte oder weniger, des zweiwertigen Eisensalzes gegen ein zweiwertiges Salz dieses Metalls. Das Ergebnis ist dann ein gemischtes Metalloidpräzipitat, das sowohl Eisen(II)- als auch Eisen(III)-oxide als auch Oxide des zweiwertigen Metalls enthält.

Bei Einsatz von Eisensalzen kann das  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Verhältnis von 1:4 bis 4:1 verändert werden, und als Ergebnis kommt immer noch ein brauchbares Produkt heraus. Es läßt sich somit eine breite Palette von Salzgemischen einsetzen.

Sobald die Salze mit der Base vermennt werden, bildet sich ein superparamagnetisches Metalloidpräzipitat. Der Einsatz von Reaktanten in einer hohen Konzentration und eine abrupte Veränderung des pH-Wertes begünstigt die Bildung von kleinen superparamagnetischen Metalloxiiden. Solche Oxide werden in den nachfolgenden Schritten dieses Verfahrens bevorzugt.

### 6.3.2 Dispersion und Oxidation

Beim zweiten Verfahrensschritt wird das in Abs. 6.3.1 gebildete superparamagnetische Metalloid dispergiert und weiter oxidiert durch Beschallen mit Ultraschall. Diese Beschallung, die bei Umgebungstemperatur oder auch bei höheren Temperaturen (bis zu  $100^\circ\text{C}$ ) durchgeführt werden kann, dient einem doppelten Zweck: sie

dient dazu, etwaige Ansammlungen von superparamagnetischen Teilchen zu dispergieren (was die letztlichen Auswirkungen des Stoffes auf die Protonenrelaxation verstärkt und somit deren Wirkungsgrad als MR-Kontrastmittel erhöht), und sie dient zudem dazu, den größten Teil des Eisen(II)-oxids ( $\text{Fe}^{2+}$ ), wenn nicht sogar das ganze Eisen(II)-oxid ( $\text{Fe}^{2+}$ ), zu Eisen(III)-oxid ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu oxidieren. Die resultierende Substanz ist bemerkenswerterweise ein lösliches superparamagnetisches Eisenoxyhydroxid, das ein superparamagnetisches Fluid bildet.

Die Beschallung läßt sich mit einem handelsüblichen Gerät durchführen, so auch in einem Durchfluß-Beschallungsgerät oder mit einer Ultraschallsonde. Ein solches Beschallungsgerät eignet sich besonders zur Verarbeitung großer Stoffmengen, und es läßt sich im Falle eines kontinuierlichen Prozesses mit einer Heiz- und einer Kühleinrichtung koppeln, um eine Erwärmung des Eisenoxids vor oder nach der Beschallung (zur Steigerung der Dispersion und Oxidation der Oxide) und eine anschließenden Kühlung des beschallten Gemischs zur Erleichterung der Sammlung zu ermöglichen.

### 6.3.3 Dialyse

Der letzte Schritt in dem Verfahren ist die Übertragung der Lösung auf einen wäßrigen, für eine Verwendung in vivo geeigneten Polycarboxylpuffer. Diese Übertragung wird durch Dialysieren des Fluids in Gegenwart des Puffers in neutralem pH-Milieu, im allgemeinen bei pH 6 - 9, vorzugsweise pH 6 - 8,3, durchgeführt. Diese Bedingungen bringen ein stabiles superparamagnetisches Fluid hervor; unter sauren Bedingungen (unter einem pH-Wert von ca. 6) setzt die Bildung einer erheblichen Menge eines Chelats des Eisens anstelle des superparamagnetischen Eisenoxids ein.

Während des Verfahrens wird das Fluid nach Abs. 6.3.3 zentrifugiert, um größere Oxidaggregate zu entfernen, und wird der Überstand in Gegenwart des Puffers dialysiert. Der bevorzugte Puffer enthält ein Citratsalz wegen dessen Eignung zur In-vivo-Verwendung und wegen dessen langen Geschichte als injizierbares Mittel, doch allgemein gilt,

daß Puffer, die Salze einer Polycarboxylsäure (wie z.B. Tartrat, Succinat oder Maleat) enthalten, die Bildung von stabilen superparamagnetischen Fluids ermöglichen. Die resultierenden Fluids können sodann autoklaviert und bis zu ihrem Gebrauch gelagert werden.

#### 6.3.4 Herstellung von stabilen superparamagnetischen Fluids, die Metalloxide mit organischen Beschichtungen enthalten

Superparamagnetische Fluids, die Metalloxide enthalten, an die organisches Beschichtungsmaterial gebunden ist, können durch Abänderungen des obigen Verfahrens hergestellt werden. Diese organischen Beschichtungsstoffe können ausgewählt werden aus einer breiten Palette von Polymerwerkstoffen, umfassend u.a. Kohlenhydrate wie Dextran (vorzugsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton), Proteine (vorzugsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton) wie z.B. Serumalbumin vom Rind oder vom Menschen, Polypeptide (vorzugsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton) wie z.B. Polylysin, und Polyglutamate und Organosilane (vorzugsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton) wie z.B. N-2-Aminoethyl-3-aminopropyltrimethoxysilan. Die Ankopplung kann, kurz gesagt, während des ersten oder des zweiten Verfahrensschrittes veranlaßt werden.

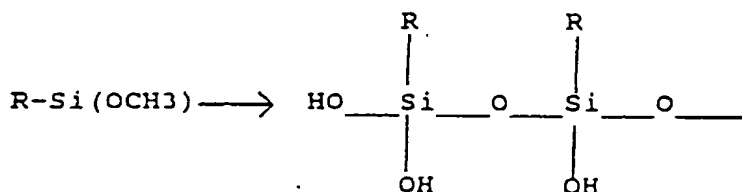
Erfolgt die Ankopplung während des ersten Verfahrensschrittes, so wird das Beschichtungsmaterial mit der Salzlösung vor der Ausfällung des superparamagnetischen Metalloids gemischt. Das Beschichtungsmaterial bindet sich an das resultierende Präzipitat und bleibt während der nachfolgenden Verfahrensschritte fest verankert. Ungebundenes Beschichtungsmaterial wird während der Dialyse (Schritt 3) entfernt. In einer bevorzugten Ausführungsart können auf diese Weise dextranbeschichtete

Eisenoxide enthaltende superparamagnetische Fluids hergestellt werden.

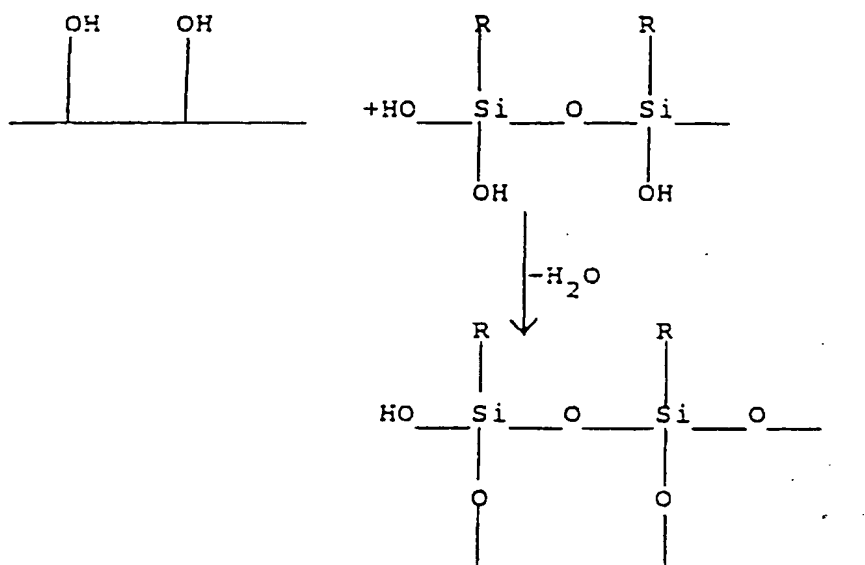
Die Anbindung kann auch während des Dispersions- und Oxidationsschritts (Schritt 2) erfolgen durch Hinzufügen des Beschichtungsmittels vor der Beschallung und anschließendes Beschallen des Gemischs mit Ultraschall zwecks Bildung des entsprechenden Oxyhydroxids. Auch hier werden die ungebundenen Beschichtungsmittel durch Dialyse entfernt.

Silanisierte Eisenoxide enthaltende superparamagnetische Fluids werden auf gleiche Weise hergestellt. Zunächst werden die Eisenoxide einer Beschallung mit Ultraschall unterzogen, um die Oxyhydroxide zu gewinnen. Dann wird das Organosilan hinzugefügt und wird das Gemisch beschallt, um die Stoffe zu dispergieren. Die Anbindung des Silans an die Oberfläche erfolgt schließlich über eine Wasserstoff abspaltende Reaktion. Die Polymerisation des Silans kann vor oder nach der Ablagerung auf der Oxyhydroxid-Oberfläche stattfinden.

In einer Ausführungsart vollzieht sich die Silanisierungsreaktion in zwei Schritten. Zunächst wird das Trimethoxysilan dem mit Ultraschall beschallten Gemisch zugesetzt, das kondensiert und Silanpolymere hervorbringt.



Sodann wird das Gemisch beschallt, woraufhin sich diese Polymere mit dem Metalloxid verbinden, vermutlich durch Knüpfen einer kovalenten Bindung mit an der Oberfläche befindlichen OH-Gruppen unter Abspaltung von Wasser:



Eine Adsoption der Silanpolymere an das Metalloxid ist ebenso denkbar.

Ein wichtiger Aspekt dieses Verfahrens ist die Dehydratationsmethode, die zur Herbeiführung der adsorptiven oder kovalenten Anbindung des Silanpolymers an das Metalloxid angewandt wird. Diese Verknüpfung wird erreicht durch Erhitzen des Silanpolymers und Metalloxids in der Gegenwart eines Benetzungsmittels, das sowohl mit organischem Lösungsmittel als auch mit Wasser mischbar ist. Glycerol mit einem Siedepunkt von ca. 290°C ist ein geeignetes Benetzungsmittel. Die Erhitzung auf ca. 105°C in der Gegenwart von Glycerol dient zwei Zwecken. Es gewährleistet die Verdampfung von Wasser, des organischen Lösungsmittels (bei dem es sich z.B. um Methanol, Ethanol, Dioxan, Aceton oder ein anderes mäßig polare Lösungsmittel handeln kann) und von etwaigem überschüssigem Silanmonomer. Darüber hinaus wird durch die Gegenwart von Glycerol die Ansammlung oder Verklumpung und mögliche Vernetzung von Teilchen verhindert, ein inhärentes Problem anderer auf dem Fachgebiet bekannter Silanisierungsverfahren, bei denen die

Dehydratation durch Erhitzen bis zur Trockenheit erreicht wird. D.h., es bilden sich nur wenige Aggregate. Alle entstandenen Aggregate werden durch Hydrolyse entfernt.

#### 6.3.5 Vorteile des Verfahrens der Herstellung von superparamagnetischen Fluids

Das zur Herstellung von superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung angewandte Verfahren ist einzigartig geeignet zur Herstellung von magnetischen Fluids, die sich für eine In-vivo-Verwendung eignen. Es lassen sich insbesondere die nachgenannten Vorteile feststellen:

1. Das Material wird zu keinem Zeitpunkt getrocknet, und es wird nach der anfangs erfolgenden Bildung der superparamagnetischen Oxide zu keinem Zeitpunkt ausgefällt. Diese Vorgänge bringen die Teilchen in unmittelbare Nähe zueinander und führen zur Verklumpung und Anhäufung, was ihre Brauchbarkeit als MR-Kontrastmittel beeinträchtigt. Desweiteren werden die Metalloxide zu keinem Zeitpunkt aus dem superparamagnetischen Fluid durch Beschallen mit Ultraschall oder Filtration entfernt; tatsächlich ist es so, daß sie sich auf diese Weise gar nicht entfernen lassen. In verdünnten Konzentrationen passieren die Metalloxide ein 0,22-Mikron ( $0,22 \cdot 10^{-6}$  m) -Filter.

2. Da das Material zu keinem Zeitpunkt (nach der anfänglichen Bildung des Eisenoxids) ausgefällt wird, sind keine Säuren oder Basen notwendig, um das Eisenoxid wieder zu lösen. Bei einem Einsatz von Säuren besteht die Neigung, Eisenoxide zu lösen, wodurch Eisen(III)-Ion entsteht, das toxisch ist und vor einer In-vivo-Verwendung entfernt werden muß. Starke Basen eignen sich ebenso kaum für eine Verwendung im Rahmen der Herstellung von pharmazeutischen Lösungen superparamagnetischer Fluids. Starke Basen können an Eisenoxide gebundene biologische Moleküle wie z.B. Proteine oder Polysaccharide



hydrolysieren. Aminhaltige starke Basen können mit Polysacchariden in der bekannten Malliard-Reaktion reagieren.

3. Veränderungen der Lösungsmittel, z.B. zu Citratpuffer, werden durch Dialyse bewirkt. Viele andere Verfahren (wie z.B. das in dem US-Patent Nr. 4.001.288 beschriebene Verfahren) der Eisenoxidherstellung erfordern die Entfernung von Eisenoxiden aus der Lösung, um Änderungen beim Lösungsmittel zu bewirken, wobei häufig eine Säure oder Base zur erneuten Lösung des Präzipitats zum Einsatz kommen.

4. Die Anbindung von Beschichtungsstoffen an die Teilchen während des Herstellungsprozesses läßt die Ankopplung einer breiten Palette von biologisch aktiven Molekülen zu wie z.B. Antikörpern, Antigenen, Serumproteinen oder anderen Stoffe. Das gebundene biologisch aktive Molekül kann dazu dienen, das superparamagnetische Mittel in vivo zu steuern, wie in Abs. 6.5 beschrieben.

#### 6.4 Eigenschaften von superparamagnetischen Fluids

##### 6.4.1 Magnetische Eigenschaften

Kennzeichnend für die nach den in Abs. 6.3 beschriebenen Verfahren hergestellten Fluids sind ein starkes magnetisches Moment in einem starken äußeren magnetischen Feld (im allgemeinen zwischen ca. 5 und ca. 90 EMU/g Metalloxid) und ein vernachlässigbares magnetisches Moment bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes (d.h. eine magnetische Rechteckigkeit von kleiner als 0,1). Ein solches Verhalten ist kennzeichnend für superparamagnetische Teilchen.

Die ABBILDUNG 4 zeigt magnetische Hystereseschleifen für typische superparamagnetische und ferromagnetische Eisenoxide. Die Magnetisierung wurde in einem Vibrations-Probenmagnetometer mit Feldern bis zu 6.000 Gauss, 25 °C, gemessen. Bei starken

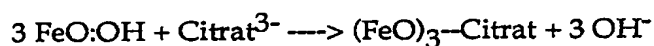
äußeren Magnetfeldern ist das superparamagnetische Fluid dieser Erfindung annähernd so magnetisch wie ferromagnetisches Eisen und weit magnetischer als das paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxid. Außerdem sind die Lösungen der hier beschriebenen Erfindung eher superparamagnetisch als ferromagnetisch, verlieren sie doch fast ihr ganzes magnetisches Moment bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes. In der Tat lassen sich die superparamagnetischen Lösungen dieser Erfindung durch eine Sättigungsmagnetisierung von 30 EMU/g oder größer charakterisieren, bei einem Verlust von mehr als 90 % dieses Magnetismus bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes.

#### 6.4.2 Retention von Citrat und Stabilität von superparamagnetischen Fluids

Die Retention von Citrat (aus wäßrigem Natrium-, Kalium- oder Ammoniumcitratpuffer) kann zur Unterscheidung der superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung von anderen Eisenoxiden genutzt werden. Untersuchungen der Citratbindungsfähigkeit von im Handel erhältlichen Eisenoxid- und Eisen(III)-oxyhydroxidformen zeigen, daß die Eisenoxide in den superparamagnetischen Fluids der hier beschriebenen Erfindung in der Lage sind, annähernd soviel Citrat wie das paramagnetische (ionische) Eisen(III)-oxyhydroxid zurückzuhalten, während Gamma-Eisen(III)-oxid und Magnetit nicht in der Lage sind, bedeutende Mengen von Citrat zurückzuhalten. Das Unvermögen von Eisenoxiden, Citrat zurückzuhalten, in Verbindung mit der Fähigkeit von Eisen(III)-oxyhydroxid, dies zu tun, läßt stark vermuten, daß Citrat nicht nach den üblichen chemischen Adsorptionsmechanismen an den Oberflächen von nach dem Verfahren dieser Erfindung hergestellten Eisenoxiden (siehe Abs. 6.3) adsorbiert. Die Retention von Anionen wie Citrat durch die superparamagnetischen Eisenoxide dieser Erfindung zeigt, daß diese Stoffe einen ionischen Charakter ähnlich den Eisen(III)-oxyhydroxiden haben.

Die Stabilität von Fluids dieser Erfindung ist in ABB. 5 dargestellt; hier wurde ein nach dem in Abs. 6.3 beschriebenen Verfahren hergestelltes superparamagnetisches Fluid einer Behandlung im Autoklaven mit und ohne Citrat unterzogen. Die Zugabe von 50 mM Citrat stabilisierte eine Lösung von 1,26 M Eisenoxid, was die Gelierung des Materials verhinderte.

Die Stabilität der Oxyhydroxidlösungen von Eisen (d.h. der superparamagnetischen Fluids) steht in Zusammenhang mit dem Austausch von Hydroxid gegen Citration. Sowohl paramagnetische Oxide als auch superparamagnetische Oxide halten Citrat in ähnlicher Weise zurück:



Statt zu versuchen, die van-der-Waals'schen Kräfte zwischen neutralen Kristallen mit Polymeren zur blockieren durch Ankopplung von Surfactanten oder Komplexbildung, dem allgemeinen von anderen bei der Herstellung von Ferrofluids verfolgten Ansatz, werden die superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung dank des ionischen Charakters des Eisenoxids und der Wahl der geeigneten Anionen stabilisiert.

Die stabilen Lösungen dieser Erfindung beinhalten eine Metallkonzentration in einem Bereich zwischen 0,05 und 5 molar und eine Citrationkonzentration zwischen 0,001 und 0,1 Mol Citrat/Mol Eisen, vorzugsweise zwischen 0,01 und 0,1 Mol Citrat/Mol Eisen bei einem pH-Wert zwischen 6 und 10. Bei zunehmender Konzentration des Eisens in der Lösung muß sich auch das Citrat/Eisen-Verhältnis erhöhen, um die Stabilität hervorzubringen. Sie sind somit mit physiologischen Gegebenheiten kompatibel.

Die superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung verdanken ihre Stabilität in Lösung nicht ihrer Polymer- oder Surfactantenbeschichtung, sondern der Existenz eines kationischen

Charakters des Eisenoxids und dessen Stabilisierung mit Anionen wie Citrat. Im allgemeinen reichen Polymerbeschichtungen, wenngleich sie zur Stabilisierung von Eisenoxiden beitragen, nicht aus, um sie vor den Härten des Autoklavierens zu schützen. Im Gegenteil, gemäß dieser Erfindung hergestellte superparamagnetische Fluids können unter Verzicht auf jegliches Polymer hergestellt werden und sind hochstabil.

#### 6.4.3 Wirksamkeit als MR-Kontrastmittel

Bei der Beurteilung von magnetischen Stoffen unter dem Aspekt der Eignung als MR-Kontrastmittel kann die Fähigkeit von Stoffen, die Protonenrelaxationszeit zu verkürzen, bedeutsamer sein als die magnetischen Stoffeigenschaften wie Magnetisierungsstärke. Da die Bilderzeugung nach dem magnetischen Kernresonanzverfahren (MR) so funktioniert, daß die Geschwindigkeiten von zwei Arten von Protonenrelaxationen in verschiedenen Geweben ermittelt werden und Abweichungen zwischen diesen Relaxationsgeschwindigkeiten zum Aufbau eines Bildes herangezogen werden, müssen die Unterschiede in den Protonenrelaxationszeiten zwischen den Geweben ausreichend groß sein, um ein Bild guter Qualität zu erhalten. Wie oben bereits festgestellt, arbeiten MR-Kontrastmittel durch Verkürzen der Protonenrelaxationszeit, und sie verbessern so den Kontrast und die allgemeine Bildqualität. Zwei Relaxationsparameter, Spin-Spin-Relaxationszeit ( $T_1$ ) und Spin-Gitter-Relaxationszeit ( $T_2$ ) genannt, werden zur Erzeugung des MR-Bildes herangezogen.

In Experimenten, bei denen es darum ging, die Wirkung dieser Stoffe als Kontrastmittel zu beurteilen, wurde festgestellt, daß die superparamagnetischen Fluids eine viel größere Wirkung sowohl auf  $T_1$  als auch auf  $T_2$  haben als alle im Handel erhältlichen Eisenverbindungen einschließlich Eisen(III)-ion-Chelat, paramagnetischen Eisen(III)-oxyhydroxiden, Gamma-Eisen(III)-oxiden und superparamagnetischen Eisenoxid-Clustern (Beispiel

7.15). Das Material dieser Erfindung ist in der Tat bemerkenswert in bezug auf seine Fähigkeit, die Protonenrelaxation zu verkürzen. Die gemäß dieser Erfindung hergestellten Stoffe sind potentere Verstärker der Protonenrelaxation als ferromagnetische Stoffe und als paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxide. Außerdem führt der stark dispergierte Zustand der Stoffe dieser Erfindung zu höheren Relaxivitäten als die Relaxivitäten, die für Stoffe, die als Cluster vorliegen, kennzeichnend sind (siehe 7.12 und Tabelle III). Das Verfahren bringt somit superparamagnetische Lösungen hervor, die auf ihre Wirkungen auf die Protonenrelaxationszeit hin optimiert sind.

Die hohe Relaxivität (siehe Tabelle III) der Stoffe dieser Erfindung ist für ihre pharmazeutische Verwendung als MR-Kontrastmittel von Bedeutung, da sie starke Auswirkungen auf das MR-Bild bei Anwendung geringer Eisendosierungen herruft. So lassen sich beispielsweise mit den gemäß dieser Erfindung hergestellten superparamagnetischen Eisenoxiden bildliche Darstellung der Leber in hohem Maße verbessern mit Dosierungen von 1 mg Eisen pro kg Körpergewicht einer Ratte, bei einer für die Ratte geltenden LD50 von über 250 mg Eisen pro Kilogramm.

## 6.5 Biologische Abbaubarkeit

Sowohl die superparamagnetischen Teilchen in den Dispersoiden als auch die Metalloxide in den superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung haben sich bei einer In-vivo-Verabreichung als biologisch abbaubar erwiesen (siehe Beispiele 7.6 und 7.15). Tatsächlich sammelt sich das Eisen, die herausragende Spezies in den Dispersoiden und Fluids, in der Leber an, wo es letztendlich abgebaut und in das Hämoglobin des Subjekts inkorporiert wird. Somit können die Dispersoide und Fluids im Rahmen der Behandlung von Anämie eingesetzt werden, und es konnte in der Tat aufgezeigt werden, daß die Fluids so wirksam

wie Imferon (ein kommerziell eingesetztes Präparat zur Behandlung von Anämie beim Menschen) bei der Wiederherstellung normaler Hämatokritwerte in anämischen Ratten sind.

#### 6.6 Steuerbarkeit

Sowohl die superparamagnetischen Teilchen in den Dispersoiden als auch die Metalloxide in den superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung können, wie oben bereits beschrieben, mit verschiedenen Beschichtungsmitteln überzogen werden. Die Verwendung solcher Beschichtungen ermöglicht es, verschiedene biologische Moleküle an das Kontrastmittel zu koppeln, um verschiedene Organe gezielt angehen zu können. So können beispielsweise Antikörper anhand einer Vielzahl von Verfahren gebunden werden, so u.a. durch Diazotisierung und Ankopplung über einen Glutaraldehyd- oder Carbodiimid-Bindungsbestandteil (Beispiele für diese Kopplungsverfahren finden sich in dem US-Patent Nr. 4.628.037). Eine Anwendung von Verfahren wie diesen bietet ein Maximum an Flexibilität, da ein antikörper-gesteuertes superparamagnetisches Metalloxid an einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp andocken kann. Dies kann die Erzeugung eines Bildes ermöglichen, das zwischen dem Zielgewebe und dem umgebenden Gewebe unterscheidet.

Neben Antikörpern können auch andere biologische Moleküle, die sich auf die Steuerbarkeit auswirken, an die Teilchen angekoppelt werden, so wie es der jeweilige Anwendungsfall vorschreibt. Einige mögliche Anwendungen sind im folgenden aufgeführt:

Antikörper

- |                                   | <u>Anwendung</u>   |
|-----------------------------------|--|
| 1. Anti-Herz-Myosin               | zur Darstellung der von einem Infarkt betroffenen Bereiche des Herzens |
| 2. Anti-Fibrin                    | Gerinnsel-Darstellung  |
| 3. Anti-T-Zellen                  | Lymphom  |
| 4. Anti-CEA                       | Darstellung von koloniebildenden Tumoren                               |
| 5. Anti-Melanom-Antikörper        | Darstellung von Melanomen  |
| 6. Anti-Eierstockkrebs-Antikörper | Darstellung von Eierstock-Krebs  |
| 7. IgG                            | Fc-Rezeptor-Skizzierung  |

Kohlenhydrate

1. Bakterielle Lipopolysaccharide
2. Zellulose
3. Mucopolysaccharide
4. Stärke
5. Kohlenhydratmodifikation nach Synthese, z.B. Dextran-beschichtung wird positiv oder negativ geladen, Diethylamino-(DEAE-)Zellulose- oder Carboxymethyl-(CM-)Dextran

<u>Hormone</u>	<u>Anwendung</u>
1. Insulin	Insulinrezeptor Status wie bei beginnender Diabetes im Erwachsenenalter
2. Thyreotropes Hormon	Schilddrüsenerkrankung
3. Acetylcholin (oder Analoge)	Skizzieren von neuronalen Rezeptoren
4. Serumlipoprotein geringer Dichte	Skizzieren von Hyper- cholesterinämie
5. Hormonanaloge einschl. Arzneistoffen	Skizzieren des endokrinen Systems und Rezeptoren
6. Serumtransferrin	Skizzieren von Trans- ferrinrezeptoren

6.7 Verfahren zur Verlängerung der  
Serumlebensdauer eines Kontrastmittels  
zur Kernspintomographie

Zur Verlängerung der Lebensdauer eines Kernspintomographie-Kontrastmittels im Serum eines Subjekts, sofern dies gewünscht wird, muß verhindert werden, daß es durch das reticuloendotheliale System (RES) absorbiert wird. Wie man festgestellt hat, läßt sich dies dadurch erreichen, daß man dem Subjekt ein Blockierungsmittel verabreicht, das mit dem Kontrastmittel wirksam um die Bindung der RES-Rezeptoren wetteifert, die für den Entzug des MR-Kontrastmittels aus dem Blutstrom verantwortlich sind. Es gibt eine Reihe von phagozytischen Rezeptoren, die unabhängig voneinander funktionieren. Das Ergebnis zeigt, daß kein einzelner Stoff gleich wirksam hinsichtlich der Blockierung aller RES-Rezeptoren ist und jedes Blockierungsmittel Spezifität für das Kontrastmittel besitzen muß.



(Siehe Davis et al., in: "Polymeric Nanoparticles and Microspheres", Gurot, P., und Covreur, P. Hrsg., [CRC Press, 1986] S. 180).

Das Verfahren beinhaltet, daß dem Subjekt eine Dosis von paramagnetischem Eisenoxid entweder vor oder zusammen mit der Verabreichung des Kontrastmittels gegeben wird. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn das paramagnetische Eisenoxid dem Kontrastmittel so ähnlich wie praktisch möglich ist, insbesondere in bezug auf Teilchengröße und Beschichtung. Nach einer kurzen Zeitspanne, im allgemeinen von 15- bis 20-minütiger Dauer, während der der paramagnetische Stoff in dem Blutstrom zirkuliert und sich an die RES-Rezeptoren anlagert, wird das Kontrastmittel verabreicht. Die richtig gewählte Dosierung des paramagnetischen Stoffes bewirkt eine starke Verlängerung der Lebensdauer des Kontrastmittels in dem Serum.

Ein ausgezeichnetes Blockierungsmittel für superparamagnetisches MR-Kontrastmittel ist eine paramagnetische Form desselben Materials. Die Erklärung hierfür ist, daß der Wirkungsgrad des Blockierungsmittels davon abhängt, ob sich ein Wettstreit um Rezeptoren einstellt; Zelloberflächenrezeptoren binden zirkulierende Stoffe vor der Aufnahme. Diese Aufnahme wird Pinozytose (Entzug von Flüssigkeiten) oder Phygozytose (Entzug von Teilchen) genannt. Kommt es zu einem Wettstreit, durch den der Entzug des superparamagnetischen MR-Kontrastmittels blockiert wird, dann wird die Entfernung des Kontrastmittels verhindert. Da die RES-Rezeptoren spezifisch sind und nur Substanzen einer bestimmten Größe oder Gestalt binden, läßt sich dieser Wettstreit am besten bei Stoffen beobachten, die physikalisch ähnlich sind. Da sich ein paramagnetisches Teilchen von einem superparamagnetischen Teilchen auch nur in den zentralen magnetischen Eigenschaften unterscheiden kann statt in seiner Oberflächenchemie, ist ein starker Wettstreit unvermeidlich, weshalb der paramagnetische Stoff ein hoch wirksamer Blocker ist.

In einer bevorzugten Ausführungsart wird dextran-beschichtetes paramagnetisches Eisenoxid als Blockierungsmittel für dextranbeschichtetes superparamagnetisches Eisenoxid eingesetzt. Dieser Stoff ist ein ideales Blockierungsmittel für dextranbeschichtete superparamagnetische Eisenoxid-Kontrastmittel, und dies aus den nachgenannten Gründen:

1. Es ist praktisch nicht nachweisbar durch Magnetresonanzverfahren.
2. Es kann anhand des für superparamagnetische Stoffe angewandten Verfahrens hergestellt werden, jedoch ohne Einsatz von zweiwertigem Eisen (das für das superparamagnetische Produkt notwendig ist). Das MR-Kontrastmittel und das Blockierungsmittel sind bis auf die Feinstruktur des Eisenoxids, die entscheidend ist für den Magnetismus und die Nachweisbarkeit durch MR, identisch. Aus der Sicht des Zelloberflächenrezeptors, der die Entfernung aus dem Blutkreislauf kontrolliert, sind das superparamagnetische Kontrastmittel und das Blockierungsmittel identisch.
3. Es ist für den Menschen ungiftig und ist festgestelltermaßen von therapeutischem Nutzen bei der Behandlung von Anämie. In der Tat ist es so, daß therapeutisch bejahtes paramagnetisches Dextran (Imferon) als Blockierungsmittel für die superparamagnetischen MR-Kontrastmittel dieser Erfindung eingesetzt werden kann.

Die Verlängerung der Serumlebensdauer ist von besonderer Bedeutung, wenn MR-Messungen zur Bestätigung der Blutzirkulation (oder des Ausbleibens der Zirkulation) vorgenommen werden. Bei diesen Messungen wird das Kontrastmittel parenteral verabreicht, danach läßt man es zirkulieren. Durch Messen von  $T_1$  und  $T_2$  läßt sich feststellen, ob eine Blutzirkulation gegeben ist oder nicht. Ein solches Verfahren kann ein wertvolles Hilfsmittel für die Diagnose von Kreislaufstörungen sein, und es kann eingesetzt werden, um das Strömen von Blut in Bereiche nachzuweisen,

wo es normalerweise ausgeschlossen ist, wie z.B. bei Schlaganfällen.

## 7 BEISPIELE

### 7.1 Herstellung von dextranbeschichteten Teilchen

Zu einer Lösung (500 ml) von 0,28 M  $\text{FeCl}_3$ , 0,16 M  $\text{FeCl}_2$  und 12,5 % (Gew./Vol.) Dextran, (Molekulargewicht 71.000 Dalton, bezogen von Sigma Chemical Company, Best.-Nr. D1390) werden 500 ml 7,5%iges  $\text{NH}_4\text{OH}$  langsam über einen Zeitraum von 2 Minuten hinzugegeben. Es bildet sich eine schwarze, magnetische Trockensubstanz bestehend aus großen und kleinen Teilchen. Das Material wird 5 Minuten lang gerührt, dann 30 Minuten lang auf 70 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung mit 1.500 x g 15 Minuten lang zentrifugiert, um große Teilchen zu entfernen, während die kleinen Teilchen 3 Tage lang gegen 10 Gallonen  $\text{H}_2\text{O}$  dialysiert werden, bei täglichem Wasserwechsel.

Die resultierenden Teilchen weisen einen Durchmesser von ca. 1.400 Angström auf, gemessen anhand des Lichtstreuemeßverfahrens.

### 7.2 Herstellung von mit Rinderserumalbumin beschichteten Teilchen

Zu einer Lösung (80 ml) von 0,5 % Rinderserumalbumin, 0,27 M  $\text{FeCl}_3$  und 0,16 M  $\text{FeCl}_2$  werden 80 ml 7,5%iges  $\text{NH}_4\text{OH}$  hinzugegeben. Es bildet sich eine schwarze, magnetische Trockensubstanz bestehend aus Teilchen. Man läßt das Gemisch 5 Minuten ruhen, bevor es 15 Minuten lang mit 1.500 x g zentrifugiert wird, um größere Teilchen zu entfernen. Das Pellet wird weggeworfen, und der Überstand wird in einen Dialysebeutel gegeben und gegen 10 Gallonen destilliertes Wasser, das dreimal

gewechselt wird, dialysiert. Größere Teilchen werden wiederum durch Zentrifugation wie oben entfernt und weggeworfen. Dann werden die Teilchen durch Ultrafiltration unter Einsatz einer XM-50-Membran und einer Rührwerk-Zellenfiltrationsvorrichtung von Amicon Corporation, Lexington, MA, konzentriert.

Die resultierenden Teilchen weisen einen Durchmesser von ca. 1.730 Angström auf, gemessen anhand des Lichtstreuemeßverfahrens.

### 7.3 Herstellung von unbeschichteten Teilchen

100 ml einer Lösung von 0,8 M  $\text{FeCl}_3$ , 0,4 M  $\text{FeCl}_2$  und 0,4 M HCL werden tropfenweise 1.000 ml 2,4%iges  $\text{NH}_4\text{OH}$  versetzt, und das Gemisch wird 5 Minuten gerührt. Es bildet sich eine schwarze, magnetische Trockensubstanz bestehend aus gut sichtbaren Teilchen. Um gut sichtbar zu sein, müssen Teilchen größer sein als die Wellenlänge von gestreutem Licht, die ungefähr 500 nm (0,5 Mikron) beträgt. Die Teilchen werden isoliert, indem man sie mit einem an der Außenseite des Reaktionsgefäßes angeordneten Permanentmagneten anzieht und die Lösung dekantiert. Zu dem magnetischen Kuchen werden 55 ml 50%iges Triethylamin in Wasser gegeben. Das Gemisch wird über Nacht gegen Wasser dialysiert, was dazu führt, daß die großen Teilchen wieder auftauchen. Sodann wird gerade so viel Triethylamin hinzugegeben, wie erforderlich ist, um wieder die kleinen Teilchen zu erzeugen, die aus der Addition von Triethylamin hervorgehen. Dann werden die Teilchen durch ein 0,2-Mikron-Filter gefiltert, was zeigt, daß das Endprodukt unter dieser Größe liegt.

#### 7.4 Verwendung von Teilchen zur Sichtbarmachung von Lebertumoren

Die Wirkungen der dextranbeschichteten Teilchen nach Abs.7.1 auf das Bild eines Rattenlebertumors sind dargestellt in der ABB. 2, die Reproduktionen von fünf Bildern zeigt, die mit einem Technicare MR-Bilderzeugungsgerät erstellt worden sind. Die in den Abbildungen 2A und 2B gezeigten Bilder wurden vor der Verabreichung des Kontrastmittels mittels unterschiedlicher Geräteeinstellungen aufgenommen, wobei in keinem der Bilder der Tumor klar zu erkennen ist; die Abbildungen 2C und 2D zeigen Bilder derselben Rattenleber, jedoch wurden diese Bilder nach intravenöser Verabreichung des dextranbeschichteten Teilchens nach Abs. 6.1 in einer Einzeldosis von 0,5 mg/kg in die Schwanzvene aufgenommen, und sie zeigen deutlich den Tumor und erlauben eine Vermessung seiner Gesamtgröße und Gestalt; in der ABB. 2E ist der Tumor durch ein Fadenkreuz als Hilfe für die Sichtbarmachung markiert.

#### 7.5 Vergleich der Wirkungen von superparamagnetischen Teilchen und von ferromagnetischen Teilchen auf T<sub>2</sub>

Die ABB. 1 vergleicht die Relaxationszeit T<sub>2</sub> von Agargel in der Gegenwart von (in Beispiel 7.1 hergestellten) dextranbeschichteten Teilchen und dem ferromagnetischen Teilchen Pf-2228 (Pfizer). Die Relaxationszeiten in der Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen eines jeden Teilchens wurden anhand eines IBM-PC-20-NMR-Spektrometers bei 0,47 Tesla (4.700 Gauss) ermittelt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das superparamagnetische Teilchen eine viel größere Wirkung auf T<sub>2</sub> ausübt als das ferromagnetische Teilchen. Angesichts der Tatsache, daß superparamagnetische Stoffe weit weniger magnetisch sind als ferromagnetische Stoffe, überrascht dieses Ergebnis doch ziemlich.

#### 7.6 Biologische Abbaubarkeit von dextranbeschichteten Teilchen

Eine Dispersion von unbeschichteten superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln in Wasser wurde intravenös in Dosierungen von 20, 37 und 243 mM Fe/kg Körpergewicht an Sprague-Dawley-Ratten verabreicht. Die Ratten wurden nach festen Zeitintervallen getötet, und  $T_2$  des Lebergewebes wurde mit Hilfe eines IBM-PC-20-NMR-Spektrometers gemessen. Die Ergebnisse sind in ABB. 3 dargestellt.

Die Daten zeigen, daß  $T_2$  nach der Verabreichung einen deutlichen Abfall erfährt und sich anschickt, sich langsam zu erholen, vermutlich auf Grund der Metabolisierung des Eisens. Die Wirkungen sind jedoch auch noch zwei Wochen nach der Verabreichung nachweisbar. Wie man auch sehen kann, sind die Wirkungen bei den höheren Dosierungen noch prägnanter. Die Teilchen haben somit eine verlängerte Lebensdauer in diesen Organen. Da die Leber und die Milz die in bezug auf die Speicherung von Eisen für die Inkorporation in das Hämoglobin wichtigsten Organe sind, wird die Theorie aufgestellt, daß diese Stoffe in das Hämoglobin der Ratte inkorporiert werden.

#### 7.7 Biodistribution von mit Rinderserumalbumin beschichteten Teilchen

0,4 mg des (in Abs. 7.2 hergestellten) mit Rinderserumalbumin beschichteten Teilchens in destilliertem Wasser wurde an sechs Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von jeweils ca. 200 g intravenös verabreicht. Es wurden jeweils zwei Ratten 90 Minuten, 24 Stunden und 7 Tage nach der Verabreichung getötet, und die Relaxationszeiten ( $T_1$  und  $T_2$ ) verschiedener Organe wurden mit Hilfe eines IBM-PC-20-NMR-Spektrometers gemessen. Die Ergebnisse sind im folgenden zusammengestellt:

TABELLE I  
BIODISTRIBUTION VON MIT RINDERSEBUMALBUMIN  
BESCHICHTETEN TEILCHEN IN RATTENORGANEN UND -  
GEWEBEN

<u>Zeit nach</u> <u>Injektion</u>		<u>Relaxationszeiten (ms)</u>			
		<u>Leber</u>	<u>Milz</u>	<u>Lunge</u>	<u>Blut</u>
Vergleich N <sup>1</sup> = 6	T <sub>1</sub>	0,279	0,544	0,688	0,786
	T <sub>2</sub>	32	48,3	57	158
90 min N = 2	T <sub>1</sub>	0,232	0,396	0,656	0,901
	T <sub>2</sub>	20	22	56	136
24 Std. N = 2	T <sub>1</sub>	0,279	0,494	0,735	1,084
	T <sub>2</sub>	22	44	68	155
7 Tage N = 2	T <sub>1</sub>	0,268	0,572	0,712	0,972
	T <sub>2</sub>	31	49	68	162

<sup>1</sup> N entspricht der Anzahl der untersuchten Ratten

Diese Daten lassen vermuten, daß sowohl das Blut als auch die Lunge das magnetische Material sehr schnell ausfiltern, da sich 90 Minuten nach der Injektion so gut wie keine Wirkung mehr auf die Relaxationszeiten feststellen läßt. Die Milz zeigt eine mäßig schnelle Erholung, indem sie 90 Minuten nach der Injektion eine wesentliche Abnahme sowohl hinsichtlich T<sub>1</sub> als auch hinsichtlich T<sub>2</sub>, jedoch nahezu keine Restwirkung 24 Stunden danach erkennen läßt. Die Leber zeigt zwei unterschiedliche Erholungsgeschwindigkeiten. T<sub>1</sub> erreicht seinen ursprünglichen Wert nach 24 Stunden, während T<sub>2</sub> nach 24 Stunden noch erheblich reduziert ausfällt und erst nach 7 Tagen eine Erholung erkennen läßt.

### 7.8 Vergleich der Biodistribution von unbeschichteten Teilchen und von dextranisierten Teilchen

Bei dieser Versuchsreihe ging es darum, die Biodistribution von drei unbeschichteten und vier dextranbeschichteten Teilchen zu untersuchen. Die unbeschichteten Mittel wurden nach dem in Abs. 7.3 beschriebenen Verfahren hergestellt, die dextranbeschichteten Teilchen wurden nach dem in Abs. 7.1 beschriebenen Verfahren hergestellt, wobei jedoch das Molekulargewicht des für die Beschichtung verwendeten Dextrans verändert wurde (siehe TABELLE II). Vor jedem Versuch wurden die Kontrastmittel gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend verschiedenen Gruppen von Sprague-Dawley-Ratten in destilliertem Wasser als Träger injiziert. Die Ratten wurden in bestimmten Abständen nacheinander getötet, und es wurden die Relaxationszeiten der Leber, Milz und Lunge mit Hilfe eines IBM-PC-20-NMR-Spektrometers bestimmt. Die Bestimmung von  $T_1$  und  $T_2$  erfolgte mittels vorprogrammierter Inversionsregenerierung bzw. Carr-, Purcell-, Meiboom- und Gill-Impulssequenzen.

Die Ergebnisse sind im folgenden zusammengefaßt:



TABELLE II

<u>Komplex</u>	<u>Über- zug</u>	<u>Dosis</u>	<u>Zeit nach</u>		<u>Relaxationszeiten (ms)</u>		
			<u>Dosis</u>		<u>Leber</u>	<u>Milz</u>	<u>Lunge</u>
Kontrolle	-	Keine-		T <sub>1</sub>	0,27	0,54	0,717
				T <sub>2</sub>	32	48	64
AMI-12	Keiner	24,2 μmol/kg	2,5	T <sub>1</sub>	0,27	0,420	0,626
			Std.	T <sub>2</sub>	22,7	26,0	45,8
			18	T <sub>1</sub>	0,254	0,532	0,752
			Std.	T <sub>2</sub>	29,6	42,9	68,2
			1	T <sub>1</sub>	0,239	0,528	0,730
			Wo.	T <sub>2</sub>	31,6	43,8	72,0
			2	T <sub>1</sub>	0,240	0,462	0,702
			Wo.	T <sub>2</sub>	29,4	35,5	79,5
			2,5	T <sub>1</sub>	0,221	0,424	0,672
			Std.	T <sub>2</sub>	16,9	28,0	65,2
AMI-13	Keiner	24,6 μmol/kg	18	T <sub>1</sub>	0,218	0,386	0,802
			Std.	T <sub>2</sub>	18,8	29,0	80,8
			1	T <sub>1</sub>	0,236	0,443	1,753
			Wo.	T <sub>2</sub>	26,0	38,5	80,4
			2	T <sub>1</sub>	0,236	0,493	0,722
			Wo.	T <sub>2</sub>	28,2	43,8	80,8
	Keiner	25,4 μmol/kg	2	T <sub>1</sub>	0,238	0,470	0,706
			Std.	T <sub>2</sub>	20,8	31,8	72,4
			18	T <sub>1</sub>	0,238	0,436	0,750
			Std.	T <sub>2</sub>	20,4	34,7	69,6
			1	T <sub>1</sub>	0,216	0,522	0,755
			Wo.	T <sub>2</sub>	26,7	41,7	80,4
			2	T <sub>1</sub>	0,227	0,452	0,698
			Wo.	T <sub>2</sub>	24,8	43,6	78,7

AMI-15	Dextran 9.000	36,8 $\mu\text{mol/kg}$	4	T <sub>1</sub>	0,238	0,300	0,672
			Std.	T <sub>2</sub>	17,8	19,4	56,4
			24	T <sub>1</sub>	0,253	0,387	0,740
			Std.	T <sub>2</sub>	21,1	26,4	73,2
			1	T <sub>1</sub>	0,219	0,485	0,766
			Wo.	T <sub>2</sub>	25,6	36,7	78,1
			2	T <sub>1</sub>	0,258	0,523	0,718
			Wo.	T <sub>2</sub>	28,7	39,1	69,9
AMI-16	Dextran 17.900	32,4 $\mu\text{mol/kg}$	4	T <sub>1</sub>	0,248	0,302	0,678
			Std.	T <sub>2</sub>	18,8	16,5	56,2
			24	T <sub>1</sub>	0,238	0,384	0,703
			Std.	T <sub>2</sub>	19,9	24,9	71,6
			1	T <sub>1</sub>	0,197	0,470	0,725
			Wo.	T <sub>2</sub>	25,3	37,1	74,6
			2	T <sub>1</sub>	0,258	0,525	0,731
			Wo.	T <sub>2</sub>	28,9	44,8	73,3
AMI-17	Dextran 35.600	33,1 $\mu\text{mol/kg}$	4	T <sub>1</sub>	0,244	0,381	0,674
			Std.	T <sub>2</sub>	16,0	17,4	54,4
			24	T <sub>1</sub>	0,247	0,388	0,690
			Std.	T <sub>2</sub>	20,2	22,9	76,4
			1	T <sub>1</sub>	0,214	0,500	0,696
			Wo.	T <sub>2</sub>	24,3	44,0	76,0
			2	T <sub>1</sub>	0,244	0,562	0,762
			Wo.	T <sub>2</sub>	28,6	48,6	70,6
AMI-18	Dextran 249.000	39,2 $\mu\text{mol/kg}$	4	T <sub>1</sub>	0,288	0,237	0,526
			Std.	T <sub>2</sub>	20,0	17,7	58,6
			24	T <sub>1</sub>	0,238	0,354	0,654
			Std.	T <sub>2</sub>	21,0	22,0	68,2
			1	T <sub>1</sub>	0,235	0,492	0,645
			Wo.	T <sub>2</sub>	31,4	36,1	71,3
			2	T <sub>1</sub>	0,240	0,52	0,748
			Wo.	T <sub>2</sub>	31,0	39,9	71,3

---

Wie zuvor legen die Daten den Schluß nahe, daß die Kontrastmittel schnell aus der Lunge abgebaut werden und in der Milz und der Leber länger präsent sind. Außerdem kann man sehen, daß die dextranbeschichteten Teilchen weniger schnell als die unbeschichteten Teilchen entfernt werden, was sich auf die T2-Werte der Leber und der Milz ca. eine Woche lang erheblich auswirkt.

### 7.9 Herstellung von superparamagnetischen Fluids, die unbeschichtete Teilchen enthalten

#### 7.9.1 Herstellung von superparamagnetischem Eisenoxid

Eine Lösung von 0,25 M Eisen(II)-chlorid und 0,5 M Eisen(III)-chlorid (600 ml) wurde zu einer Lösung von 5 M NaOH (600 ml) hinzugegeben. Es bildete sich ein schwarzes magnetisches Oxidpräzipitat. Dieses Präzipitat wurde wiederholt mit einer Base gewaschen und dekantiert, bis ein pH-Wert von ca. 9 erreicht war.

#### 7.9.2 Dispersion und Oxidation

400 ml magnetisches Oxid (ca. 15 g) aus Abs. 7.9.1 und 25 ml gekühlte Essigsäure wurden zusammen in einen Becher gegeben und vermischt. Sodann wurde eine Schallsonde in den Becher eingeführt, und die Lösung wurde mit hoher Intensität 2 Minuten lang beschallt. Die Schallsonde wurde wieder herausgenommen, und die Lösung wurde mit 1.000 x g 20 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde weggeworfen, die überstehende Flüssigkeit wurde zurückbehalten.

### 7.9.3 Transfer zu Citratpuffer

Der Überstand aus Abs. 7.9.2 wurde gegen Ammoniumcitratpuffer dialysiert unter Zuhilfenahme eines Hohlfaser-Dialyse-/Konzentrationsapparats Modell DC2 (AMICON Corp. Danvers, MA). Bei dem Ammoniumcitratpuffer handelte es sich um 10 mM Citrat, eingestellt auf pH 8,2 durch Zugabe von  $\text{Na}_4\text{OH}$ . Das Ergebnis ist ein autoklavierbares, homogenes superparamagnetisches Fluid.

### 7.10 Herstellung eines wäßrigen, stabilen superparamagnetischen Fluids, das Metalloxid mit anhaftendem Dextran enthält

#### 7.10.1 Synthese von Eisenoxid

5 Liter einer Lösung, die 755 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  und 320 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  enthält, wurden langsam zu 5 Litern 16%igem  $\text{Na}_4\text{OH}$ , das 2.500 g Dextran (MW = 10,000 bis 15,000) enthielt, hinzugegeben. Die Eisensalzlösung wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten und ständigem kräftigen Rühren der Base zugesetzt.

Es bildete sich ein schwarzer magnetischer Brei.

#### 7.10.2 Dispersion, Oxidation und Erhitzung

Die 10 Liter Brei (aus Abs. 7.10.1) wurden durch ein Durchfluß-Beschallungsgerät gepumpt, das an eine 100°C-Heizspiralen- und Kühlspiralen-Anlage wie in ABB. 6 dargestellt angeschlossen war. Die Pumpgeschwindigkeit betrug ungefähr 0,4 Liter pro Minute, und der Pumpvorgang wurde ungefähr 30 Minuten lang fortgesetzt. Die resultierende Lösung wurde anschließend zentrifugiert, und das ausgefällte Pellet wurde weggeworfen.

7.10.3 Entfernung von nicht in Reaktion getretenem Dextran, Transfer zu Citratpuffer und Sterilisation

Der Überstand (aus Abs. 7.10.3) wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 l mit entsalztem, sterilem Wasser verdünnt, und die resultierende Lösung wurde dialysiert wie in Beispiel 7.9 beschrieben, wobei jedoch ein größerer Dialyse-/Konzentrationsapparat, der DC 10, zum Einsatz kam. Die Kartusche des Dialyseapparats besaß ein Molekulargewicht-Ausschlußvermögen von 100.000 Dalton, was die Entfernung von Dextran erlaubte. Eine Ultrafiltration wurde in nichtkontinuierlicher Weise durchgeführt, wobei das Volumen von 20 l auf 5 l verringert und Lösung in 16-l-Chargen hinzugegeben wurden. Fünf Chargen à 16 l entsalztes, destilliertes Wasser wurden hinzugegeben.

Dann wurde Natriumcitrat als 1 M Citratpufferansatz zugesetzt und wurde die Lösung wie in Beispiel 7.9 dialysiert. Das resultierende Citrat wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Das Citrat/Eisen-Verhältnis lag in der Endlösung zwischen 0,01 und 0,1 Citrat/Fe. (Beispielsweise lagen bei einer Eisenkonzentration von 1,26 M 0,04 M Citrat vor.) Das magnetische Fluid wurde in Flaschen abgefüllt und autoklaviert (121 °C, 30 Minuten). Das Ergebnis ist ein steriles homogenes magnetisches Fluid, wie in ABB. 5 gezeigt.

7.11 Herstellung eines wäßrigen, stabilen superparamagnetischen Fluids, das Metalloxid mit angelagertem Silan enthält

7.11.1 Herstellung von Eisenoxid

Eine Lösung von 0,25 M Eisen(II)-chlorid und 0,5 M Eisen(III)-chlorid (600 ml) wurde zu einer Lösung von 5 M NaOH (600 ml) gegeben. Es bildete sich ein schwarzes magnetisches Oxidpräzipitat, das wiederholt mit einer Base gewaschen und dekantiert wurde, bis ein pH-Wert von 9 erreicht war.

7.11.2 Dispersion, Oxidation und Silanisierung

400 ml magnetisches Oxid (aus Abs. 7.11.1, ungefähr 15 g) wurden mit 25 ml gekühlter Essigsäure in einem Becher gemischt. Dann wurde eine Schallsonde in den Becher eingeführt, und die Lösung wurde mit hoher Intensität 2 Minuten lang beschallt. Die Schallsonde wurde wieder entfernt, und es wurden 30 ml N-2-Aminoethyl-3-aminopropyltrimethoxysilan zugesetzt. Das resultierende Gemisch wurde dann wie zuvor beschallt. Die magnetische Lösung wurde anschließend zu 200 ml Glycerol bei 50°C hinzugegeben. Die Temperatur wurde auf 105°C erhöht, und das Wasser wurde verdampft.

Auf Grund der angewandten Beschallung ist das Material in Beispiel 3 weit kleiner als das Material, das in dem US-Patent Nr. 4.55.088 beschrieben ist. Wegen seiner geringen Größe kann es nicht mit handgeführten Magneten manipuliert werden. Der Schritt der Glyceroldehydration wurde aus dem US-Patent Nr. 4.554.088 übernommen.

### 7.11.3 Entfernung von nicht in Reaktion getretenem Silan und Transfer zu Citratpuffer

Der Glycerolbrei aus Abs. 7.11.2 wurde zu ca. 800 ml Wasser gegeben. Große Zusammenschlüsse von magnetischen Teilchen wurden durch 20-minütiges Zentrifugieren des Breies mit 1.000 x g entfernt. Der Überstand wurde anschließend gegen Citratpuffer in einer Hohlfaser-Dialysevorrichtung wie in Beispiel 6.9 dialysiert.

### 7.12 Wirkungen des superparamagnetischen Fluids auf die Protonenrelaxationszeit

Die Auswirkungen von Substanzen auf ein In-vivo-MR-Bild können mit Hilfe eines Magnetresonanz-(MR-)Spektrometers beurteilt werden. Bei dieser Untersuchung wurde ein Gerät vom Typ IBM-PC-20 eingesetzt, das  $T_1$  und  $T_2$  bei 25°C, 0,47 Tesla und 20 MHz mißt. Eine Verbesserung der Protonenrelaxation läßt sich quantifizieren, indem man die Steigung einer Kurve von  $1/T$ , dem Reziprokwert der Relaxationszeit, der Konzentration des Kontrastmittels gegenüberstellt. Die Kurve verläuft im allgemeinen linear, und die Steigung wird als die Relaxivität und mit  $R_1$  und  $R_2$  bezeichnet. Relaxivität wird angegeben in der Einheit  $M^{-1} s^{-1}$ . Höhere Relaxivitätswerte geben an, daß Material bei abnehmenden Protonenrelaxationszeiten mehr Kraft pro Mol Eisen besitzt und somit auch ein stärkeres Kontrastmittel ist. Es wurden die Relaxivitäten für eine Reihe von verschiedenen Formen von magnetischen Stoffen ermittelt. Die nachgenannten Materialien wurden untersucht:

Superparamagnetisches Fluid gemäß dieser Erfindung: Ein dispergiertes Fluid, das einzelne superparamagnetische Kristalle von gemäß dem Beispiel 7.10 hergestelltem Eisenoxid enthält. Die Magnetisierungskurve dieses Materials ist in ABB. 4 dargestellt.

$\text{Fe}_2\text{O}_3$ : Ein ferromagnetisches Gamma-Eisen(III)-Oxid, das für die Datenaufzeichnung eingesetzt wird. Dieses Material wurde bezogen von Pfizer Corp., Minerals, Pigments and Metals Division, Bestellnummer 2228.

Cluster: Ein silanisierter Cluster von superparamagnetischem Eisenoxid mit mehreren 10 bis mehreren Hundert Kristallen, gepackt in  $\mu$ -großen Teilchen. Dieses Material wurde nach dem US-Patent Nr. 4.554.088 hergestellt.

$\text{FeO:OH}$ : ein paramagnetisches Eisen(III)-oxyhydroxid, das im Rahmen der Behandlung von Anämie eingesetzt wird. Es wurde bezogen von Fisons Corporation und wird unter den Handelsnamen Proferdex (Fisons corporation) und Imferon (Merrill Dow Inc.) vertrieben.

$\text{Fe}^{3+}$ /DTPA: ein löslicher Komplex aus Eisen(III)-ion und Diethylentriaminpentaacetsäure (DTPA). (Die Daten für dieses Material stammen von Lauffer et al., J. Comp. Assist. Tomog. 9(3), S. 431 [1985]).

Die Ergebnisse sind im folgenden zusammengefaßt:

---

TABELLE III

WIRKUNGEN VERSCHIEDENER FORMEN VON EISEN  
AUF DIE PROTONENRELAXATIONSZEIT

<u>Material</u>	<u>R1</u> ( $\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ )	<u>R2</u> ( $\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ )
Superpara- magnetisches Fluid	$4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
Gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3$	100	$7,2 \times 10^3$
$\text{FeO:OH}$	0	60
Cluster	$2 \times 10^3$	$3 \times 10^4$
$\text{Fe}^{3+}$ /DTPA	$0,73 \times 10^3$	$0,85 \times 10^4$

---



Kurz gesagt, das Material dieser Erfindung ist, wie die hohen Werte von R1 und R2 zeigen, bemerkenswert in bezug auf seine Fähigkeit, die Protonenrelaxationszeiten zu verkürzen. Zum Vergleich, der Wert von R2 für ferromagnetisches Dextranmagnetit ist  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Ohgushi et al., J. Mag. Res. 29, S. 599 [1978]). Dies ist der höchste in der Literatur belegte Wert für R2, soweit den Autoren bekannt. Die gemäß dieser Erfindung hergestellten Stoffe sind stärkere Verbesserer der Protonenrelaxationszeit als ferromagnetische Stoffe und als paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxide.

Hinzu kommt, daß gut dispergierte Stoffe wie die dieser Erfindung höhere Relaxivitäten als Cluster-Materialien aufweisen. Das Verfahren dieser Erfindung bringt somit superparamagnetische Lösungen hervor, die auf ihre Auswirkungen auf die Protonenrelaxation hin optimiert sind.

#### 7.13 Massenmagneteigenschaften von superparamagnetischen Fluids

Magnetische Hystereschleifen wurden für Proben des superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung, Gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (ferromagnetisch) und  $\text{FeO}:\text{OH}$  (paramagnetisch), untersucht in Beispiel 7.12, mit Hilfe eines handelsüblichen Vibrations-Probenmagnetometer mit Feldern bis zu 6.000 Gauss, 25°C, erstellt. Die Ergebnisse sind in ABB. 4 dargestellt.

Kurz gesagt, bei starken äußeren magnetischen Feldern ist das superparamagnetische Fluid dieser Erfindung annähernd so magnetisch wie ferromagnetisches Eisenoxid und weit magnetischer als das paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxid, indem es eine hohe magnetische Sättigung zeigt. Die Fluids dieser Erfindung sind eher superparamagnetisch als ferromagnetisch, indem sie fast ihr gesamtes magnetisches Moment bei Fehlen eines äußeren magnetischen Feldes verlieren.

#### 7.14 Retention von Citrat

Die Retention von  $^{14}\text{C}$ -Citrat nach einer Dialyse kann genutzt werden zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Eisenoxidformen, wie in Tabelle IV gezeigt. Alle Eisenoxide wurden vor der Verwendung zunächst gegen einen Puffer aus 1 mM Tris-Cl, pH 8, dialysiert. Dann wurde eine Gleichgewichtsdialyse durchgeführt, um die Fraktion des zurückgehaltenen Citrats zu bestimmen. Die Eisenkonzentration betrug 17,8 mM, die Citratkonzentration betrug 2,6 mM. Die superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung halten Mengen von Citrat zurück ähnlich den handelsüblichen Eisen(III)-oxyhydroxiden, was darauf hinweist, daß das Eisen in beiden Präparaten in einer ähnlichen chemischen Form vorliegt. Im Handel erhältliche Eisenoxidformen wie z.B. Gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3$  oder  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  halten keine erheblichen Citratmengen zurück (das Gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3$  war dasselbe wie das, das in den Beispielen 7.12 und 7.13 verwendet wurde, während das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  von Fisher Scientific Inc. bezogen worden war). Das Unvermögen dieser handelsüblichen Eisenoxide, Citrat zurückzuhalten, gekoppelt mit der Fähigkeit von Eisen(III)-oxyhydroxid, dies zu tun, läßt stark vermuten, daß Citrat nicht über die üblichen chemischen Adsorptionsmechanismen an Eisenoxidoberflächen adsorbiert. Die Retention von Citrat durch die superparamagnetischen Eisenoxide dieser Erfindung zeigt, daß diese Stoffe einen ionischen Charakter haben, der den Eisen(III)-oxyhydroxiden ähnlich ist.

TABELLE IV  
RETENTION VON CITRAT DURCH LÖSUNGEN MIT  
VERSCHIEDENEN EISENOXIDEN

<u>Material</u>	<u>Je Eisen zurückgehaltenes Citrat</u> (mol/mol)
FeOH:OH	0,026
Erfindung	0,019
Gamma-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,0028
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,0018

#### 7.15 Stabilität von superparamagnetischen Fluids

Superparamagnetische Fluids, die gemäß Beispiel 7.9 hergestellt worden waren, wurden einer Behandlung im Autoklaven mit unterschiedlichen Citratkonzentrationen unterzogen. Bei einer Eisenkonzentration von 1,26 M wurden verschiedene Konzentrationen von Ammoniumcitrat, pH 8, hinzugegeben, und die resultierenden Lösungen wurden 1 Stunde lang auf 121 °C erhitzt. Die Ergebnisse sind in ABB. 5 dargestellt. Die 6 Ampullen in Abb. 5B enthielten, wie gezeigt, Citratkonzentrationen von 100, 50, 25, 15, 10 bzw. 5 mM Citrat. Die Ampullen waren während des Autoklavierens in aufrechter Position, jedoch wurden sie für das Foto in die waagerechte Position gebracht. In der waagerechten Lage der Ampullen ist das Vorkommen von geliertem Material sichtbar, sofern der obere Teil der Ampulle durchsichtig ist. Die ganz geschwärzten Ampullen (Citratkonzentrationen zwischen 15 und 100 mM) weisen darauf hin, daß eine Lösung von superparamagnetischen Stoffen bewahrt worden ist. Die zwei Ampullen rechts (Citratkonzentration von 5 und 10 mM) zeigen, daß sich ein Gel gebildet hat. Die ABB. 5A zeigt desweiteren das charakteristi-

sche Gel, gewonnen ohne Citrat oder mit ungeeignetem Citrat (5 und 10 mM Citrat).

#### 7.16 Biologische Abbaubarkeit von superparamagnetischen Fluids

Paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxide sind biologisch abbaubar und werden seit langem zur Behandlung von Anämie eingesetzt. Daher wurde die biologische Abbaubarkeit der superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung mit den paramagnetischen Eisen(III)-oxyhydroxiden verglichen. Die Fähigkeit beider Präparate, Anämie bei Ratten umzukehren, wurde als ein Modell herangezogen. Das paramagnetische Eisen(III)-oxyhydroxid war Imferon, mit angelagertem Dextran. Das superparamagnetische Fluid war auch mit Dextran gekoppelt und war wie in Beispiel 7.10 beschrieben hergestellt worden.

Entwöhnte Rattenbabies wurden in vier Gruppen von jeweils fünf Ratten aufgeteilt. Die Ratten in Gruppe 1 erhielten ein eisenhaltiges Futter und wurden in den Wochen 5, 6, 7 und 8 getötet, um die Herstellung normaler Eisen-(Hämatokrit-)werte im Rattengewebe zu gestatten. Die Ratten in Gruppe 2 wurden ebenso in den Wochen 5, 6, 7 und 8 getötet, um die Herstellung normaler Eisenwerte im Rattengewebe zu gestatten. Die Ratten in den Gruppen 2, 3 und 4 erhielten eine sehr eisenarme Kost. Nach der Einnahme der eisenarmen Kost über 5 Wochen erhielten die Ratten in der Gruppen 3 und 4 intravenöse (Schwanzvene) Injektionen von Eisen, um ihre Anämie umzukehren und um wieder normale Werte herzustellen. Die Ratten in Gruppe 3 erhielten Proferdex, während die Ratten in Gruppe 4 das dextransierte superparamagnetische Fluid erhielten. Den Ratten, die Eisen erhielten, wurde eine Einzeldosis von 30 mg Eisen pro kg injiziert, einer ausreichenden Dosis, um ihre Anämie umzukehren. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt.

---

TABELLE V  
UMKEHRUNG VON ANÄMIE MIT HILFE VON  
SUPERPARAMAGNETISCHEN EISENOXIDTEILCHEN

Hämatokrit (1 % rote Zellen in Vollblut)

	Woche 5		Woche 6		Woche 7		Woche 8	
	DS	ED	DS	ED	DS	ED	DS	ED
Futter	45,1	1,4	45,2	0,5	46,7	0,9	47,0	0,8
wenig Fe	28,5	2,6	29,5	2,1	32,7	1,2	34,8	2,3
Imferon			43,1	1,9	42,8	1,3	46,3	1,2
Erfindung			44,3	2,3	42,7	1,1	47,6	1,6

DS = Durchschnitt

ED = Einzeldosis

---

Es läßt sich feststellen, daß das superparamagnetische Eisenoxid dieser Erfindung die Wiederherstellung normaler Hämatokritwerte bei Ratten genauso gut wie das paramagnetische Präparat Imferon bewirkt.

#### 7.17 Übersicht über die Eigenschaften von superparamagnetischen Fluids

Die Eigenschaften der superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung verglichen mit Lösungen, die mit anderen Arten von Eisen(III)-oxid hergestellt worden sind, sind in Tabelle VI zusammengefaßt:

TABELLE VI

ÜBERSICHT ÜBER DIE EIGENSCHAFTEN VON WÄSSRIGEN  
LÖSUNGEN VERSCHIEDENER EISEN(III)-OXIDE

	Magnet sättigung (ABB. 4)	MR- Relaxivität (Tabelle II)	Biologische Abbaubarkeit (Tabelle V)	Citrat- retention (Tab. IV)
FeOH:OH	gering	keine	stark	stark
Gamma-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	stark	etwas		gering
Erfindung	stark	stark	stark	stark

D.h., die superparamagnetischen Fluids dieser Erfindung besitzen eine einzigartige Kombination aus magnetischen, biologischen und Anionenretentions-Eigenschaften.

7.18 Verlängerung der Serumlebensdauer von  
dextranbeschichteten superparamagnetischen  
Eisenoxidteilchen

Zur Bewertung der Effektivität von dextranbeschichtetem paramagnetischem Eisenoxid als Lebensdauer-Verlängerer wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt.

In beiden Versuchen wurde in eine Ratte von 300 g Körpergewicht 1 mg Fe/kg Körpergewicht dextranbeschichtetes superparamagnetisches Metalloxid, das wie in Beispiel 7.1 beschrieben hergestellt worden war, injiziert. In einem Versuch jedoch wurden der Ratte 15 Minuten vor dem Empfang des superparamagnetischen Materials zusätzlich 2,5 mg Fe/kg dextranbeschichtetes paramagnetisches Eisenoxid injiziert (hergestellt nach dem in Beispiel 7.1. beschriebenen Verfahren, wobei jedoch kein zweiwertiges Salz verwendet wurde). Der T<sub>2</sub>-Wert des Bluts des Subjekts wurde periodisch über die darauffolgenden 3 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Kurz gesagt, in beiden Versuchen fiel der Blut- $T_2$ -Wert innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe des superparamagnetischen Materials drastisch ab. Der Wert jedoch kehrte rasch auf seinen Normalwert in der Ratte zurück, die nicht den superparamagnetischen Stoff erhalten hatte, vermutlich wegen der Adsorption des Mittels durch das reticuloendotheliale System (RES). Im Gegensatz dazu dehnte sich die  $T_2$ -Dämpfung drastisch aus bei Einsatz des paramagnetischen Mittels. Dies ist die Folge eines Wettstreits zwischen superparamagnetischem und paramagnetischem Material um RES-Rezeptoren, was die Lebensdauer des superparamagnetischen Mittels stark verlängert.

## Übersetzung

Ansprüche

1. Ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen superparamagnetischen Fluids, dessen pH-Wert zwischen pH 6 und pH 9 liegt, die nachgenannten Verfahrensschritte umfassend:

- (i) Bilden von superparamagnetischen Metalloxidpartikeln durch basisches Ausfällen von zweiwertigen und dreiwertigen Metallsalzen;
- (ii) Dispergieren und Oxidieren der besagten superparamagnetischen Metalloxidpartikel durch Beschallen mit Ultraschall bei einer Temperatur zwischen Umgebungstemperatur und 100°C, um ein superparamagnetisches Fluid hervorzubringen;
- (iii) Zentrifugieren des besagten superparamagnetischen Fluids und Zurückbehalten des Überstandes; und
- (iv) Dialysieren des Überstandes in Gegenwart eines Polycarboxylat-puffers mit einem pH-Wert zwischen pH 6 und pH 9.

2. Das Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zweiwertigen und dreiwertigen Metallsalzen um Eisensalze handelt, die in einem Verhältnis zwischen 1:4 und 4:1 vorliegen.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den zweiwertigen und dreiwertigen Eisensalzen um  $\text{FeCl}_2$  und  $\text{FeCl}_3$  handelt.

4. Das Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es desweiteren den Verfahrensschritt des Austauschens eines Teils des zweiwertigen Eisensalzes gegen ein zweiwertiges Kobalt- oder Mangansalz umfaßt.

5. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der ausgetauschte Eisensalz-Anteil die Hälfte oder weniger als die Hälfte ausmacht.

6. Das Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Beschallung mit Hilfe einer Ultraschall-Vorrichtung



erfolgt, ausgewählt aus der Gruppe umfassend einen Schallkopf und ein Durchfluß-Ultraschallgerät.

7. Das Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte Polycarboxylatpuffer ausgewählt wird aus der Gruppe umfassend einen Citratpuffer, einen Succinatpuffer, einen Maleatpuffer und einen Tartratpuffer.

8. Eine Verbindung, die ein stabiles superparamagnetisches Fluid enthält und die sich anhand der nachgenannten Verfahrensschritte gewinnen läßt:

(i) Bilden von superparamagnetischen Metalloxidpartikeln durch basisches Ausfällen von zweiwertigen und dreiwertigen Metallsalzen:

(ii) Dispergieren und Oxidieren der besagten superparamagnetischen Metalloxidpartikel durch Beschallen mit Ultraschall bei einer Temperatur zwischen Umgebungstemperatur und 100°C, um ein superparamagnetisches Fluid hervorzubringen;

(iii) Zentrifugieren des besagten superparamagnetischen Fluids und Zurückbehalten des Überstandes, der superparamagnetische Partikel enthält, von denen ein jeder:

(a) ein oder mehrere einzelne superparamagnetische Metalloxidkristalle mit einem Durchmesser zwischen 50 und  $500 \cdot 10^{-10}$  m enthält; und

(b) einen mittleren Gesamtdurchmesser zwischen 50 und  $5000 \cdot 10^{-10}$  m aufweist;

und

(iv) Dialysieren des Überstandes in Gegenwart eines Polycarboxylatpuffers mit einem pH-Wert zwischen pH 6 und pH 9.

9. Die Verbindung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die besagten Partikel biologisch abbaubar sind, wie ihre Fähigkeit, von einem Subjekt innerhalb von 30 Tagen nach Verabreichung abgebaut zu werden, beweist.

10. Die Verbindung gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel mit einer Polymerbeschichtung versehen sind.

11. Die Verbindung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Polymerbeschichtung ein Molekulargewicht zwischen 5.000 und 250.000 Dalton aufweist.

12. Die Verbindung gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Polymerbeschichtung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus einem Kohlenhydrat, einem Protein, einem Polypeptid und einem Organosilan.

13. Die Verbindung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem besagten Kohlenhydrat um ein Dextran handelt.

14. Die Verbindung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Dextran ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus einem Dextran mit 17.900 Dalton, einem Dextran mit 35.600 Dalton, einem Dextran mit 71.000 Dalton und einem Dextran mit 249.000 Dalton.

15. Die Verbindung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem besagten Protein um Albumin handelt.

16. Die Verbindung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Albumin ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Serumalbumin vom Menschen und Serumalbumin vom Rind.

17. Die Verbindung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Polypeptid ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Polyglutamat und Polylysin.

18. Die Verbindung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem besagten Organosilan um N-2-Aminoethyl-3-aminopropyltrimethoxysilan handelt.

19. Die Verbindung gemäß den Ansprüchen 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie desweiteren ein Biomolekül enthält, das kovalent an die besagte Polymerbeschichtung gebunden ist und das funktionelle Gruppen besitzt, die in der Lage sind, die Erkennung der Partikel durch Rezeptoren verschiedener Organe oder Gewebe nach Verabreichung der Partikel an ein Subjekt zu erleichtern.

20. Die Verbindung gemäß den Ansprüchen 8 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte Polycarboxylatpuffer ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus einem Citratpuffer, einem Tartratpuffer, einem Succinatpuffer und einem Maleatpuffer.

21. Die Verbindung gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß besagter Citratpuffer abgeleitet wird aus dem aus der Gruppe bestehend aus Natriumcitrat, Kaliumcitrat und Ammoniumcitrat ausgewählten Salz.

22. Die Verbindung gemäß den Ansprüchen 8 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem besagten Metalloxid um ein Eisenoxid handelt.

23. Die Verbindung gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß:

(i) die Eisenkonzentration des Eisenoxids zwischen 0,05 und 5 mol liegt;

(ii) das Polycarboxylat-Gegenion des besagten Polycarboxylatpuffers in einer Konzentration zwischen 0,001 und 0,1 mol Polycarboxylat-Gegenion pro mol Eisen vorliegt; und

(iii) der pH-Wert des besagten Fluids zwischen pH 6 und pH 8,3 liegt.

24. Ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung eines nach dem Kernspinsresonanz-(MR-)Verfahren aufgenommenen In-vivo-Bildes eines tierischen oder menschlichen Organs oder Gewebes, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbesserung die Verabreichung einer bildverbessernden Dosis eines Kernspintomographie-(MRI-)Kontrastmittels an das Tier oder den Menschen beinhaltet, wobei das Kontrastmittel das superparamagnetische Fluid gemäß den Ansprüchen 8 bis 23 enthält.

25. Das Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Kontrastmittel nach der aus der Gruppe bestehend aus Intravaskulärer Injektion, oraler Verabreichung, Sondierung und Einlauf gewählten Methode verabreicht wird.

26. Das Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das bildlich darzustellende Organ ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus dem Magendarmtrakt, dem reticulo-endothelialen System und dem vaskulären System.

27. Das Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Organ oder Gewebe des Magendarmtrakts ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus der Speiseröhre, dem Dünndarm und dem Dickdarm.

28. Das Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Organ oder Gewebe des reticulo-endothelialen Systems ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus der Leber, der Milz, den Lymphknoten, dem Knochenmark, dem Nervengewebe und der Lunge.

29. Eine pharmazeutische Verbindung, die die Verbindung gemäß den Ansprüchen 8 bis 23 enthält.

30. Die pharmazeutische Verbindung gemäß Anspruch 29 zur Verwendung als ein zur Bilderzeugung nach dem Kernspinresonanz-Verfahren in vivo eingesetztes Kontrastmittel.

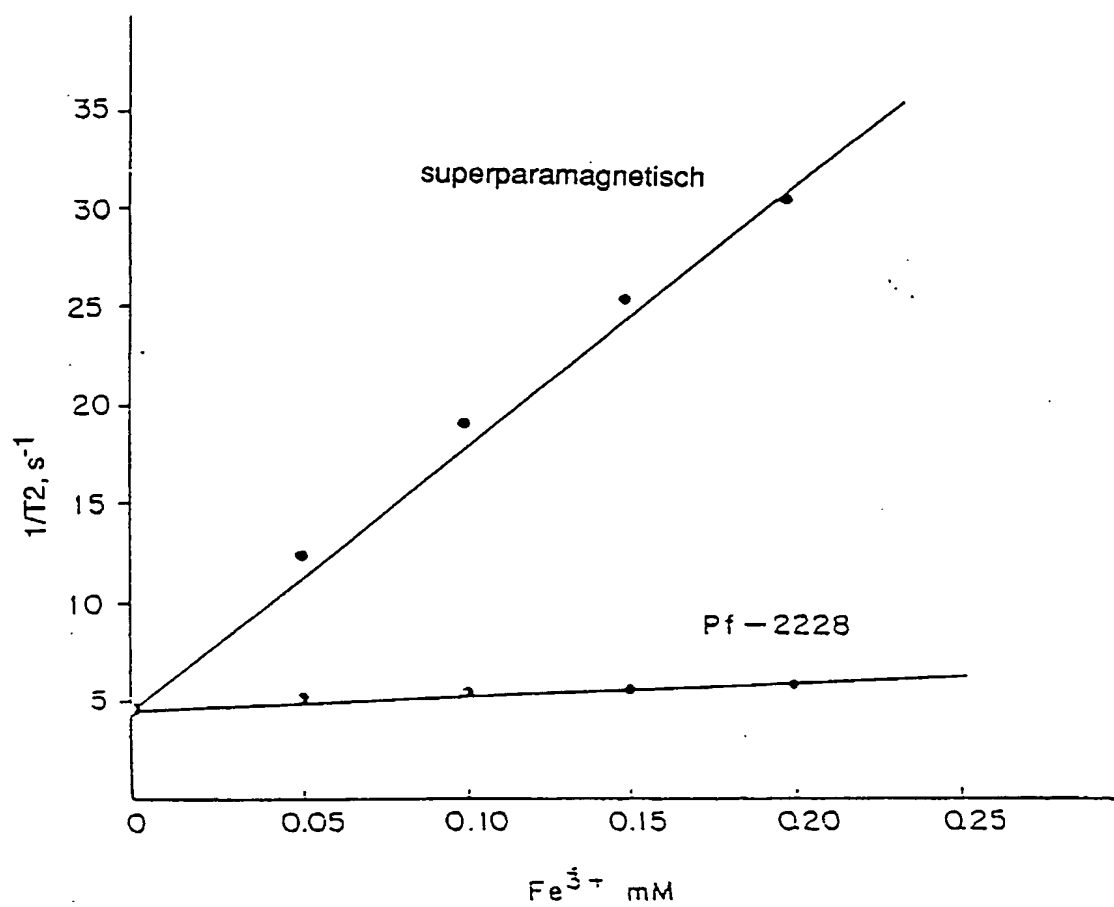
31. Die pharmazeutische Verbindung gemäß Anspruch 29 zur Verwendung zum Zwecke der Anämie-Abschwächung bei einem Tier oder einem Menschen.

32. Die pharmazeutische Verbindung gemäß Anspruch 31 umfassend eine wirksame Menge eines Fluids, das biologisch abbaubare superparamagnetische Eisenoxidpartikel sowie einen Polycarboxylatpuffer enthält, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Eisenoxidpartikel:

- a) aus ein oder mehreren einzelnen biologisch abbaubaren superparamagnetischen Eisenoxiddkristallen bestehen;
- b) einen mittleren Gesamtdurchmesser zwischen 50 und  $5.000 \cdot 10^{-10}$  m aufweisen;
- c) sich biologisch abbauen lassen, wie die Inkorporierbarkeit des Eisens der besagten Eisenoxidpartikel in das Hämoglobin eines Subjekts innerhalb von 30 Tagen nach Verabreichung beweist;
- d) in der Lage sind, in Lösung als Kationen zu wirken; und
- e) durch den Polycarboxylatpuffer mit einem pH-Wert zwischen pH 6 und pH 9 auf Grund der zwischen den kationischen Eisenoxidpartikeln und den Polycarboxylatanionen des Polycarboxylatpuffers wirkenden Anziehungskräfte stabilisiert werden.

33. Die pharmazeutische Verbindung gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Partikel mit einer Polymerbeschichtung versehen sind.

ABB. 1



2/7



ABB. 2A



ABB. 2B



ABB. 2C



ABB. 2D

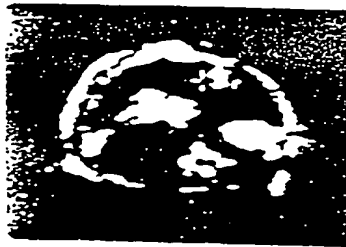


ABB. 2E

ABB. 3

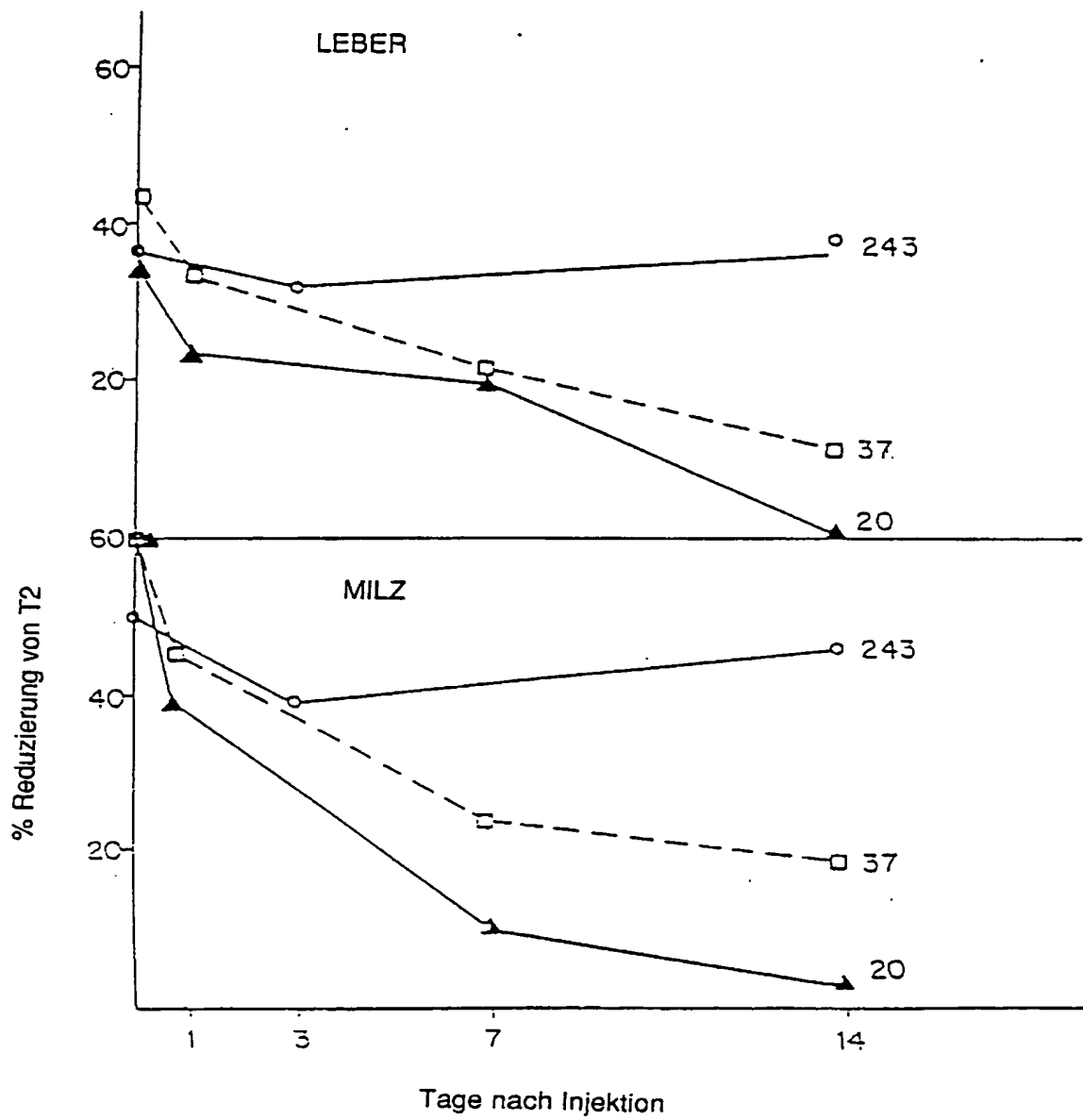
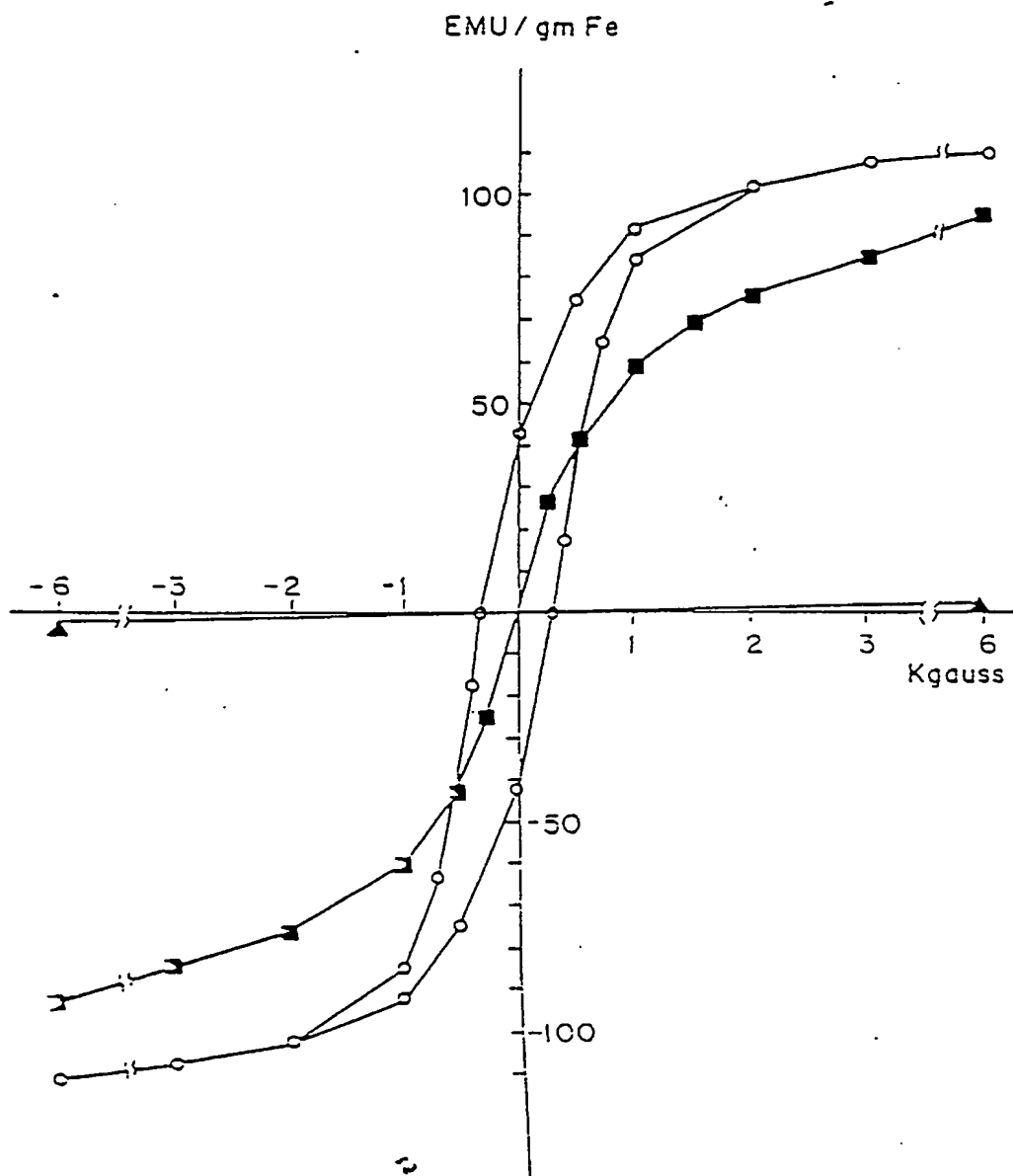


ABB. 4





5/7

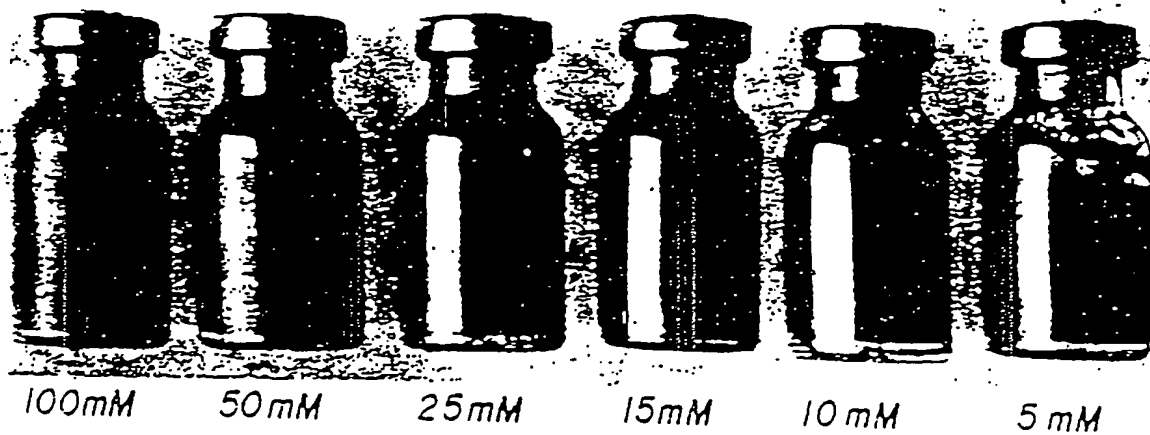


5mM



10mM

ABB. 5A



100mM

50mM

25mM

15mM

10mM

5mM

ABB. 5B

ABB. 6

Prinzipskizze der Anlage zur Synthetisierung von stabilen  
superparamagnetischen Fluids

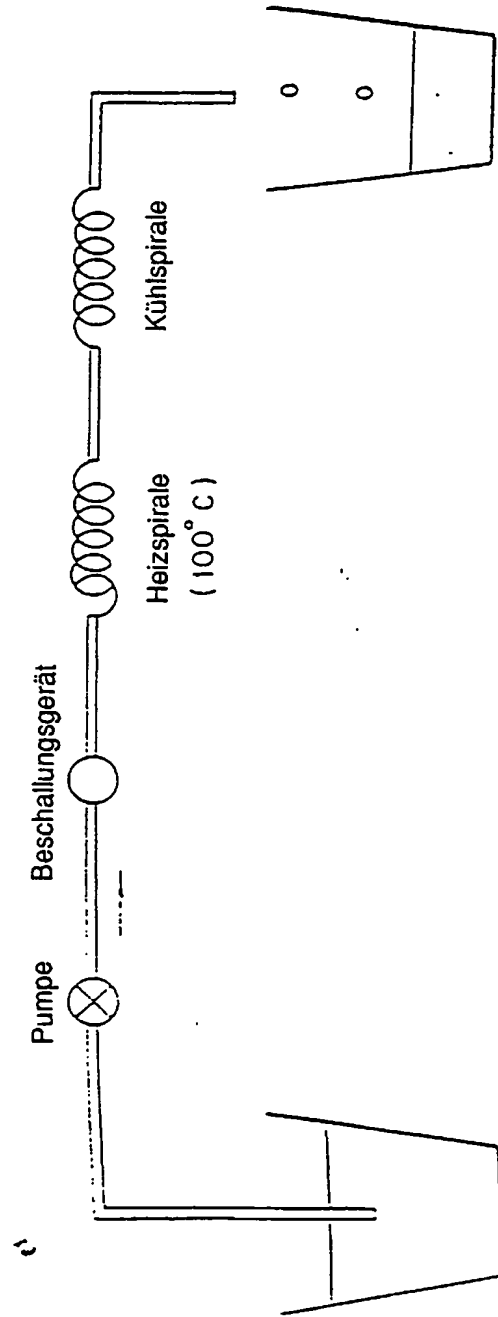
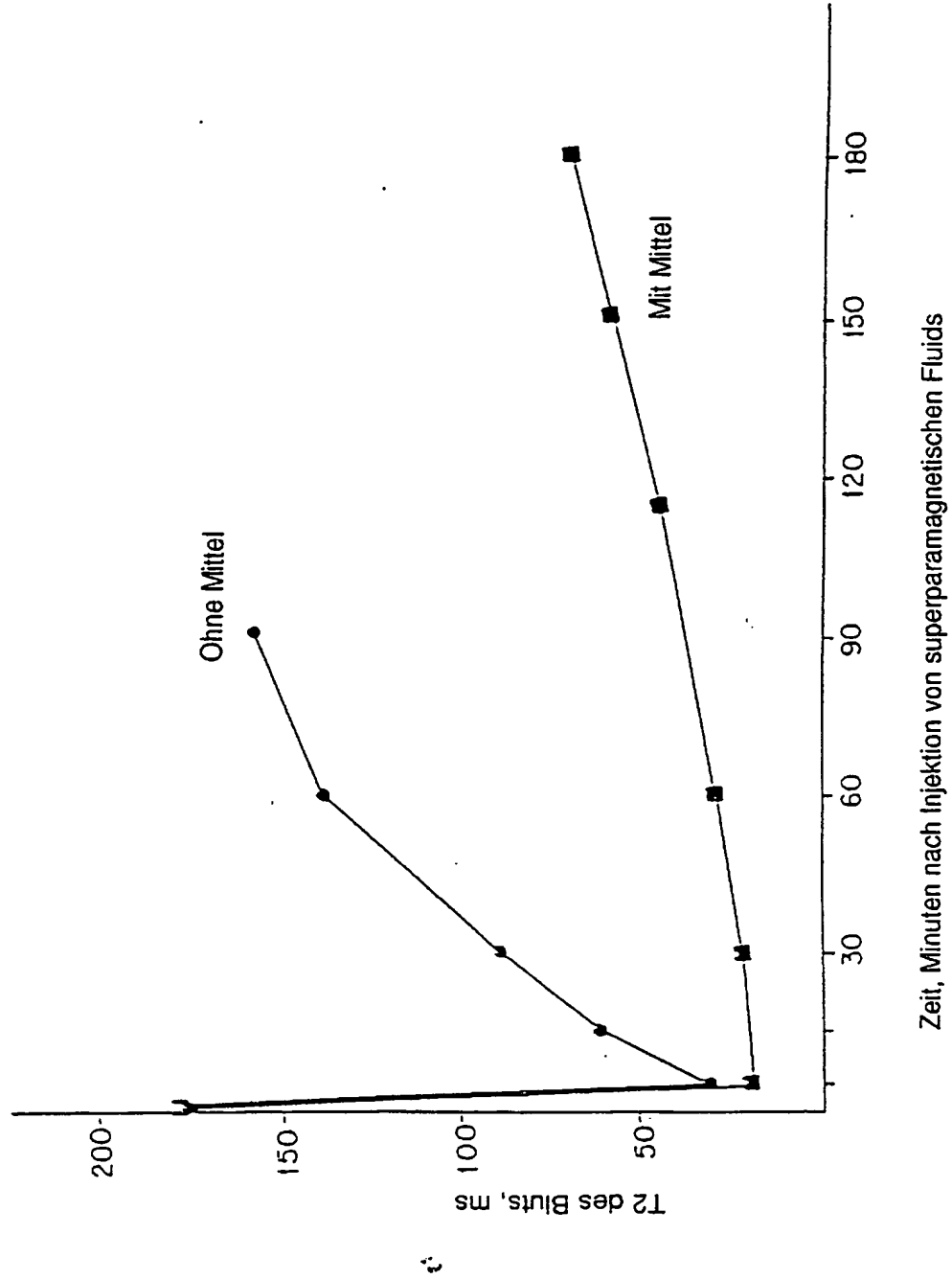


ABB. 7

Dämpfung von T2 des Bluts mit hemmendem Mittel



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**